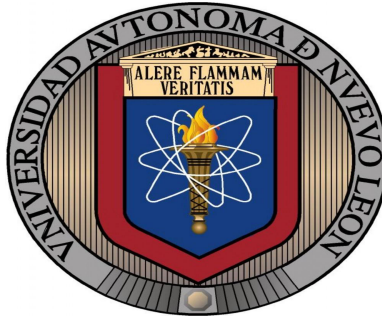


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA
DIFERENCIACIÓN Y MUERTE CELULAR EN LA LÍNEA DE LEUCEMIA
MIELÓGENA CRÓNICA HUMANA K562**

Por

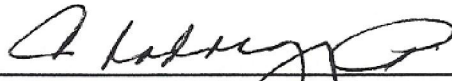
M.C. CRYSTEL ALEYVICK SIERRA RIVERA

**Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Noviembre 2015

**EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA
DIFERENCIACIÓN Y MUERTE CELULAR EN LA LÍNEA DE LEUCEMIA/
MIELÓGENA CRÓNICA HUMANA K562**

Comité de tesis



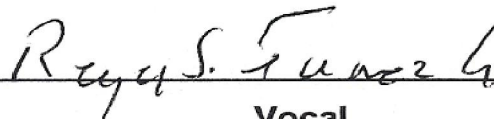
Directora de tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla



Secretario

Dr. Moisés Armides Franco Molina



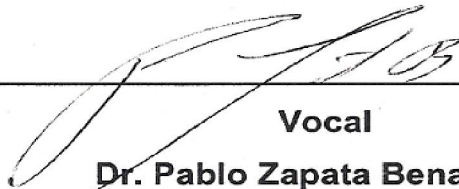
Vocal

Dr. Reyes S. Tamez Guerra



Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa



Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.



AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico y la infraestructura para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
NOMENCLATURA	viii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Hematopoyesis	2
2.2 Sistema hematopoyético	3
2.3 Diferenciación y maduración celular	5
2.4 Citocinas involucradas en la hematopoyesis y en la respuesta inmunológica	6

2.5 Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	7
2.6 Interleucina-1 (IL-1)	8
2.7 Interleucina-6 (IL-6)	9
2.8 Quimiocinas	9
2.9 Actividades biológicas de las quimiocinas	10
2.10 Clasificación de las quimiocinas	10
2.11 Leucemias	13
2.12 Clasificación de las leucemias	15
2.13 Leucemia mielógena crónica Historia y epidemiología	17
2.14 Cromosoma Filadelfia (Ph)	17
2.15 Efectos de la oncoproteína BCR-ABL	19
2.16 Evolucion clínica de la LMC	20
2.17 Tratamiento	21
2.18 Interferón alfa (IFN- α)	22
2.19 Imatinib	22

2.20 Mecanismos de resistencia al imatinib	24
2.21 Dasatinib	24
2.22 Nilotinib	25
2.23 Otros fármacos y modalidades en la terapia contra LMC	26
2.24 Nuevas estrategias terapéuticas relacionadas con la inducción de la diferenciación celular	26
2.25 IMMUNEPOTENT CRP	30
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1 IMMUNEPOTENT CRP	36
5.2 Líneas celulares	36
5.3 Condiciones del cultivo celular y tratamientos	37

5.4 Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos	37
5.5 Evaluación de la viabilidad celular sobre K562, MOLT-3, monocitos primarios humanos y macrófagos peritoneales murinos tratados con el IMMUNEPOTENT CRP	38
5.6 Análisis de proliferación celular mediante azul de tripano	38
5.7 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	39
5.8 Evaluación de las características morfológicas mediante la tinción de Romanowsky	40
5.9 Evaluación de la expresión de los marcadores de superficie CD14 ⁺ , CD68 ⁺ , CD163 ⁺ y CD42a ⁺	40
5.10 Evaluación de la actividad fagocítica mediante citometría de flujo	41
5.11 Determinación de la producción de óxido nítrico mediante ensayo colorimétrico	41
5.12 Análisis de la producción de citocinas y quimiocinas mediante citometría de flujo	42
5.13 Análisis estadísticos	43

6. RESULTADOS	44
6.1 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de K562, MOLT-3, monocitos primarios humanos y macrófagos peritoneales murinos	44
6.2 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre el ciclo y proliferación celular en la línea K562	48
6.3 IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación celular hacia los linajes monocito/macrófago y megacariocítico en la línea celular K562	52
6.4 Determinación de la resistencia celular en la línea K562	58
6.5 IMMUNEPOTENT CRP disminuye la producción de óxido nítrico y altera la producción de los niveles de citocinas y quimiocinas en la línea celular K562	59
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIÓN	69
9. LITERATURA CITADA	70
RESUMEN BIOGRÁFICO	78

“Ganamos la fortaleza de lo que aprendemos a vencer”

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre iluminar mi camino en todo momento y darme serenidad, fortaleza y confianza en los instantes difíciles, ayudándome siempre a salir adelante y concluir con mis metas planteadas.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por ser mi directora de tesis y permitirme desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Inmunología y Virología, pero principalmente por su disponibilidad y apoyarme durante todo el desarrollo del proyecto de investigación, mi más sincero aprecio y agradecimiento.

Al Dr. Reyes Tamez Guerra, por formar parte del comité de tesis y permitirme realizar esta investigación doctoral.

Al Dr. Moisés Armides Franco Molina, por la asesoría en este trabajo de investigación y por la formación académica durante mi estancia en el laboratorio, así como por su amistad.

Al Dr. Edgar Mendoza Gamboa, por la asesoría y la disponibilidad para la revisión de los artículos científicos durante toda mi formación profesional y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Pablo Zapata, por la asesoría, consejos y apoyo durante todos los años que he cursado en el laboratorio.

A la Dra. Itza Eloisa, por su amistad y apoyarme en los momentos requeridos.

A todos los maestros que han participado en mi desarrollo profesional, los cuales han repercutido benéficamente en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca brindada para mis estudios.

A mi familia: principalmente a mis tíos y a mi abuelita por apoyarme y estar presentes en cada logro y dificultad.

A mis amigos: Edgar, que siempre estaba para apoyarme en todo momento, pero sobre todo en los peores y siempre lograba generar una sonrisa en mí, a Mariel que siempre mostro su amistad y aprecio.

A Carmen, que más que mi amiga es la hermanita que no tuve, que hemos reído y llorado juntas, y por todos los buenos momentos que hemos pasado Edgar, tu y yo, los quiero mucho amigos.

A mis compañeros de laboratorio: Yaris, Erika, Karen, Óscar, Alex, Rilque y todos los chicos de servicio social que han pasado por el laboratorio 6, los cuales siempre han sido colaborativos y serviciales.

A los integrantes de otros laboratorios del Departamento de Inmunología y Virología: Edgar, Santiago, Ashanti, Cynthia, Karla, Manuel, Talyha y todas las personas que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres:

Sra. Virginia Rivera Guzmán y Sr. Alejandro Sierra Gutiérrez

Les agradezco infinitamente el apoyo, la confianza y el amor que siempre me han demostrado, por estar siempre cuando los necesito y orientarme en todas las decisiones que he tomado en la vida, algunas de ellas sencillas y otras complicadas. Los quiero muchísimo, y valoro con gran admiración todos los esfuerzos que han realizado en el transcurso de mi vida, con la finalidad de sacar adelante mis metas planteadas, todos los logros que he obtenido son gracias a ustedes. Los adoro y le agradezco tanto a Dios que me haya dado a padres tan maravillosos.

Gracias por todo...

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Producción de células sanguíneas a partir de la médula ósea: hematopoyesis	2
Figura 2. Modelo jerárquico de la hematopoyesis	5
Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular	6
Figura 4. Tipos celulares afectados en base al progenitor transformado	16
Figura 5. Principal translocación cromosómica presente en la LMC	18
Figura 6. Regulación de la oncoproteína Bcr-Abl	19
Figura 7. Evolución de la LMC	21
Figura 8. Estructura química del imatinib	22
Figura 9. Mecanismo de acción del imatinib	23
Figura 10. Estructura química del desatinib	25
Figura 11. Estructura química del nilotinib	25

Figura 12. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea K562	45
Figura 13. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea MOLT-3	46
Figura 14. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos y monocitos primarios humanos	47
Figura 15. IMMUNEPOTENT CRP induce arresto celular en fase S y G ₂ /M del ciclo celular en la línea K562	49
Figura 16. IMMUNEPOTENT CRP inhibe la proliferación celular de la línea celular K562	50
Figura 17. IMMUNEPOTENT CRP inhibe la proliferación celular después de la inducción de la diferenciación celular en la línea K562	51
Figura 18. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación monocítica/macrófago en la línea celular K562	52
Figura 19. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación monocítica/macrófago en la línea celular K562 evaluado por la expresión del marcador de superficie CD14 ⁺	53
Figura 20. IMMUNEPOTENT CRP induce polarización hacia macrófagos M2 evaluado mediante la expresión del marcador CD163 ⁺ en la línea celular K562	55

Figura 21. IMMUNEPOTENT CRP incrementa la actividad fagocítica en la línea celular K562	56
Figura 22. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación megacariocítica en la línea celular K562 evaluado por la expresión del marcador de superficie CD42 ⁺	57
Figura 23. Efecto de la dosis citotóxica del IMMUNEPOTENT CRP sobre la línea celular K562 tratada previamente a dosis de diferenciación del IMMUNEPOTENT CRP	58
Figura 24. IMMUNEPOTENT CRP disminuye la producción del óxido nítrico en la línea celular K562	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Morbilidad hospitalaria de la población mexicana	14
Tabla 2. Morbilidad por tumores malignos	14
Tabla 3. IMMUNEPOTENT CRP afecta la producción de IL-6, IL-8 y TNF- α en la línea celular K562	61
Tabla 4. IMMUNEPOTENT CRP afecta la producción de las quimiocinas en la línea celular K562	63

NOMENCLATURA

APC	Célula presentadora de antígenos
ARA-C	Arabinósido de citosina
ATP	Adenosíntrifosfato
ATRA	Acido retinoico <i>trans</i>
CAT	Catalasa
CB	Crisis blástica
CLP	Progenitor linfoide común
CMP	Progenitor mieloide común
MEP	Progenitor megacariocítico/eritrocítico
GMP	Progenitor granulocítico/macrófago
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DnmT	Metil transferasas
FA	Fase acelerada

FC	Fase crónica
GPx	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDAC	Histonas deacetilasas
HSC	Células hematopoyéticas pluripotenciales
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
IFN- α	Interferón-alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
KDa	Kilodaltones
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMA	Leucemia mielolde aguda
LMC	Leucemia mielógena crónica

LPA	Leucemia promielocítica aguda
LPS	Lipopolisacárido
LSC	Células madre leucémicas
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPPs	Progenitores multipotentes
nM	Nanomolar
O ₂	Oxígeno
ON	Oxido nítrico
PBS	Tampón fosfato salino
Ph	Cromosoma filadelfia
PMA	Forbol miristato acetato
RARs	Receptores del ácido retinoico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades
VCR	Viabilidad celular relativa
VD ₃	1 α -25 dihidroxivitamina D ₃
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

RESUMEN

Introducción: La leucemia mielógena crónica es una enfermedad clonal mieloproliferativa resultado de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas pluripotenciales, constituye alrededor del 20% de todas las leucemias que padecen los adultos, la edad promedio de su aparición es alrededor de los 53 años. La enfermedad presenta una evolución trifásica: constituida por la fase crónica, caracterizada por la acumulación de células del linaje granulocítico, evolucionando posteriormente a la fase acelerada y crisis blástica, en la cual las células leucémicas pierden la capacidad de diferenciación por lo que se ha propuesto como estrategia terapéutica la inducción de la diferenciación terminal de las células leucémicas blásticas hacia un linaje específico (monocítico, granulocítico, eritrocítico) evitando de esta manera las altas tasas de proliferación. El principal objetivo de este estudio fue demostrar el potencial del IMMUNEPOTENT CRP en la inducción de muerte y diferenciación celular en la línea de leucemia mielogénica crónica K562.

Métodos: Las líneas celulares K562 y MOLT-3 así como monocitos humanos y macrófagos peritoneales murinos fueron tratadas con IMMUNEPOTENT CRP, PMA y DMSO durante 96 horas, posteriormente la viabilidad, proliferación y ciclo celular fueron evaluados. Para determinar el linaje hacia el cual se dirigiría la diferenciación celular se realizó la tinción de Romanowsky para observar los cambios morfológicos tras los tratamientos se analizaron los porcentajes de expresión de los marcadores de superficie CD14⁺, CD68⁺, CD163⁺, CD42a⁺ así como la actividad fagocítica, evaluación de la producción de óxido nítrico por ensayo colorimétrico, citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) y quimiocinas (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES y CXCL8/IL-8) en sobrenadantes celulares fueron evaluadas por citometría de flujo.

Resultados: Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP a 1 U/mL, incrementa el porcentaje de muerte celular en las líneas K562 y MOLT-3 alrededor del 97%, sin afectar la viabilidad de los monocitos humanos y macrófagos peritoneales murinos permaneciendo alrededor de 75% y 80%, respectivamente, mientras que los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP en un rango de 0.07 – 0.35 U/mL, inducen diferenciación celular en la línea K562 hacia el linaje monocítico/macrófago con fenotipo M2, y en un porcentaje bajo hacia el linaje megacariocítico, incrementando la fase S del ciclo celular e induciendo un aumento en la actividad fagocítica, esta última de manera similar al tratamiento con el PMA. La producción de óxido nítrico fue disminuida con el tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP, mientras que la producción de citocinas y quimiocinas mostraron alteraciones similares al tratamiento con PMA.

Conclusiones: Los resultados obtenidos indican que el IMMUNEPOTENT CRP posee efecto anti-leucémico mediante la inducción de la diferenciación celular hacia los linajes monocítico/macrófago y megacariocítico inhibiendo la proliferación celular, sugiriendo que podría ser un candidato efectivo en el tratamiento de las leucemias.

ABSTRACT

Background: Chronic myelogenous leukemia is a clonal myeloproliferative disease result of neoplastic transformation of hematopoietic stem cells constitutes about 20% of all adults suffering from leukemia, the average age of onset is around 53 years. The disease has a three-phase evolution constituted by chronic phase, characterized by the accumulation of cells of granulocytic lineage, later evolving to accelerated phase and blast crisis, in which the leukemic cells lose the differentiation capacity so has been proposed as a therapeutic strategy inducing terminal differentiation of leukemic blast cells into a specific lineage (monocytic, granulocytic, erythrocytic) thereby preventing the high proliferation rates. The main objective of this study was to demonstrate the potential of IMMUNEPOTENT CRP in inducing cell death and differentiation in the line of K562 chronic myelogenous leukemia.

Methods: The cell lines K562 and MOLT-3 and human monocytes and murine peritoneal macrophages were treated with IMMUNEPOTENT CRP, PMA and DMSO for 96 hours, then the viability, proliferation and cell cycle were evaluated. To determine the lineage to which led to the cell differentiation Romanowsky staining was performed to observe the morphological changes after the treatments and the expression of the surface markers CD14⁺, CD68⁺, CD163⁺, CD42a⁺ as well as the phagocytic activity, assessing the production of nitric oxide by colorimetric assay, cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α) and chemokines (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES and CXCL8 /IL-8) in cell supernatants were assessed by flow cytometry.

Results: The results obtained show that high doses of IMMUNEPOTENT CRP increased the cell death on K562 and MOLT-3 lines about 97%, without affecting the viability of human monocytes and murine peritoneal macrophages remained around 75% and 80%, respectively, low doses of IMMUNEPOTENT CRP induce differentiation in K562 cell line to the monocyte/macrophage lineage with M2

phenotype, and weakly to the megakaryocyte lineage, the S phase increased with IMMUNEPOTENT CRP and also, the phagocytic activity was similar to treatment with the PMA. The nitric oxide production was decreased with treatment with IMMUNEPOTENT CRP and cytokines and chemokines production showed similar alterations to treatment with PMA on a minor scale.

Conclusions: Our study demonstrates that IMMUNEPOTENT CRP exhibits an antileukemia effect by inhibit the K562 cell proliferation and induces the differentiation toward the monocyte/macrophage and megakariocytic lineages suggesting that might be an effective candidate for the treatment of leukemias.

1. INTRODUCCIÓN

Las células leucémicas pierden la capacidad de diferenciación por lo que proliferan rápidamente, a pesar de que los recuentos de glóbulos blancos son altos en estos pacientes, las funciones inmunológicas son deficientes. Por lo que se ha investigado el efecto de diversos agentes que induzcan la diferenciación en las células leucémicas conduciendo a un arresto en el ciclo celular, evitando las altas tasas de proliferación, es conocido que los quimioterapéuticos conducen a la generación de efectos secundarios y resistencia después de un periodo prolongado de administración, afectando la calidad de vida de los pacientes que cursan la enfermedad; estudios han demostrado que extractos de plantas con potente actividad antioxidante como *Rosmarinus officinalis* y *Curcuma longa* potencian la diferenciación *in vitro* inducida con $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D (VD_3) e *in vivo* incrementando la sobrevida en modelos de leucemia murina (Gocek y Marcinkowska, 2011), por lo que en la actualidad no solo se requiere de agentes que induzcan citotoxicidad en las células tumorales, hoy en día es prometedor el uso de agentes que induzcan la diferenciación de las células leucémicas, potenciando la erradicación tumoral. El IMMUNEPOTENT CRP es una sustancia de bajo peso molecular (<12kDa) extraída de bazos de bovinos, y se ha observado que ejerce efectos moduladores sobre el sistema inmunológico, principalmente en la patología del cáncer (Franco-Molina et al., 2010) por lo que el objetivo de este estudio fue investigar su desempeño en el área de diferenciación celular ya que es un campo atractivo para el desarrollo de estrategias terapéuticas, generando células diferenciadas funcionales que desempeñen una actividad inmunológica capaz de actuar en contra de la progresión tumoral.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hematopoyesis

Diariamente se producen más de un millón de células maduras por segundo en el adulto humano, mediante el proceso conocido como hematopoyesis encargado de la formación, desarrollo, diferenciación y maduración de los elementos de la sangre (Figura 1), donde inicialmente las células madre hematopoyéticas pluripotenciales (HSC del inglés “*Haematopoietic stem cells*”) identificadas por Till y McCulloch en 1961; que residen en la médula ósea tienen la capacidad bajo condiciones apropiadas de dar origen a todos los tipos de células sanguíneas maduras las cuales forman parte fundamental de la homeostasis celular del organismo (Seita y Weissman, 2010), evitando el desarrollo de enfermedades, tal es el caso de los eritrocitos o glóbulos rojos; que tienen la función del transporte de oxígeno hacia todo el organismo; las plaquetas, cuya función consiste en el control de la hemorragia, y los leucocitos o glóbulos blancos, implicados en la respuesta celular inmunológica del huésped.

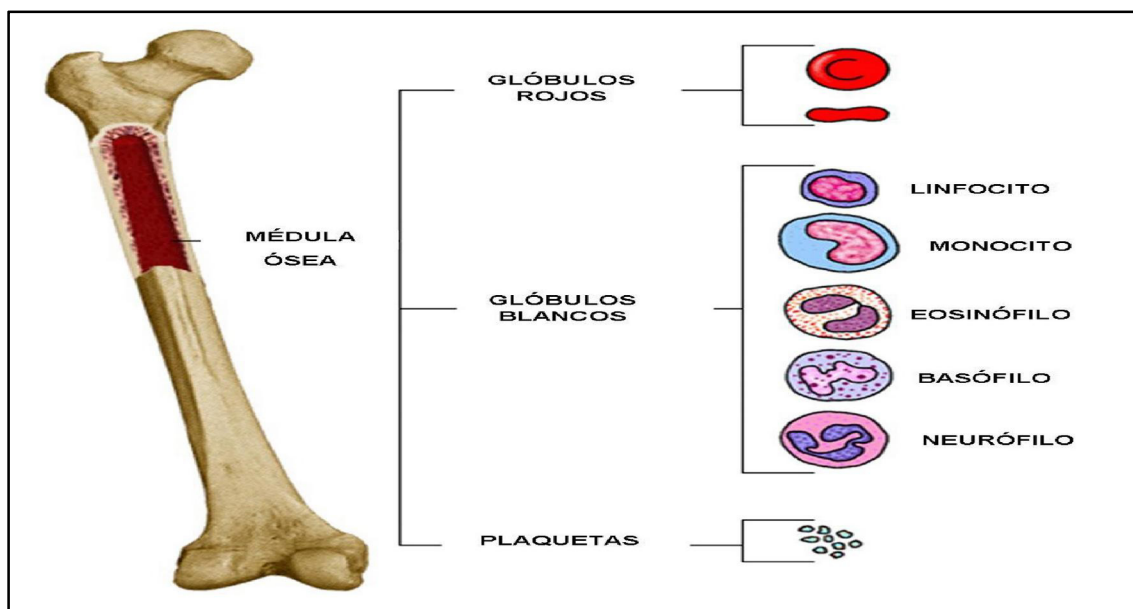


Figura 1. Producción de células sanguíneas a partir de la médula ósea: hematopoyesis.

2.2 Sistema hematopoyético

El sistema hematopoyético se divide en base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que origina. De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimientos: 1) células madre hematopoyéticas pluripotenciales (HSC), 2) progenitores multipotentes (MPP), 3) progenitores oligopotentes y 4) células maduras efectoras. Las células madre hematopoyéticas pluripotenciales (HSC), que corresponden al 0.01 – 0.2% del total de las células presentes en la médula ósea, poseen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse; es decir, al dividirse por lo menos una de las dos células hijas conserva las propiedades de la célula madre, manteniéndose en un estado indiferenciado; por lo que el fondo común de las células progenitoras no se agota, debido a esta propiedad las HSC poseen la capacidad de generar todo el sistema hematopoyético a partir de una única célula y de mantener la hematopoyesis durante toda la vida de un individuo (Parslow et al., 2003) y la segunda es que son multipotenciales; lo cual indica que se comprometen a la diferenciación que conduce a la producción de uno o más grupos específicos de células sanguíneas (Mayani et al., 2007). Las HSC se mantienen en estado quiescente o fase G_0 del ciclo celular manteniendo los conteos celulares en médula ósea regulados, la importancia de este balance es vital para garantizar la integridad genómica de las HSC ya que la latencia también protege a las HSC de la proliferación incontrolada lo que resultaría en el agotamiento (Riether et al., 2015) así mismo como las replicaciones cromosómicas frecuentes pueden inducir mutaciones en el DNA causando alteraciones en la diferenciación de las HSC (Seita et al., 2010). En respuesta a señales de diferenciación, las HSC se diferencian hacia progenitores multipotentes (MPPs), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Las MPPs constituyen el segundo compartimento del sistema hematopoyético, el cual corresponde al 0.5% del total de células de la médula ósea; comparten características inmunofenotípicas con las

HSC, pero presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares de acuerdo al linaje que pertenecen (Figura 2), posteriormente algunas de ellas se diferencian hacia progenitores oligopotentes comprometidos con linajes específicos ya sea linfoide (CLP) o mieloide (CMP) constituyendo el tercer compartimiento, constituyendo >90% de las células hematopoyéticas residentes, estas células poseen alta capacidad proliferativa, pero son incapaces de auto-renovarse, y su potencial de diferenciación está restringido a linajes específicos (Seita et al., 2010). Estos progenitores oligopotentes dan lugar a todas las células efectoras del sistema hematopoyético, las CLP posteriormente dan origen a las células Pro-T, Pro-B y Pro-NK finalmente originando células T, B y NK, proceso conocido como linfopoyesis y las CMP dan origen a progenitores megacariocíticos/eritrocíticos (MEP) y progenitores granulocíticos/macrófagos (GMP), para generar plaquetas, eritrocitos, granulocitos y macrófagos, respectivamente, proceso conocido como mielopoyesis (Figura 2). Las células maduras exceden en número considerable a sus precursores menos diferenciadas, pero estas últimas proliferan de forma continua. Debido a que al diferenciarse se pierde su capacidad de proliferación y auto-renovación. En resumen, la hematopoyesis se regula de manera precisa con el propósito de: 1) mantener un fondo común disponible de HSC, 2) regular la asignación, proliferación y diferenciación de las células en todas las etapas de cada vía hematopoyética y 3) modular la actividad de cada vía en respuesta a las demandas fisiológicas (Parslow et al., 2003).

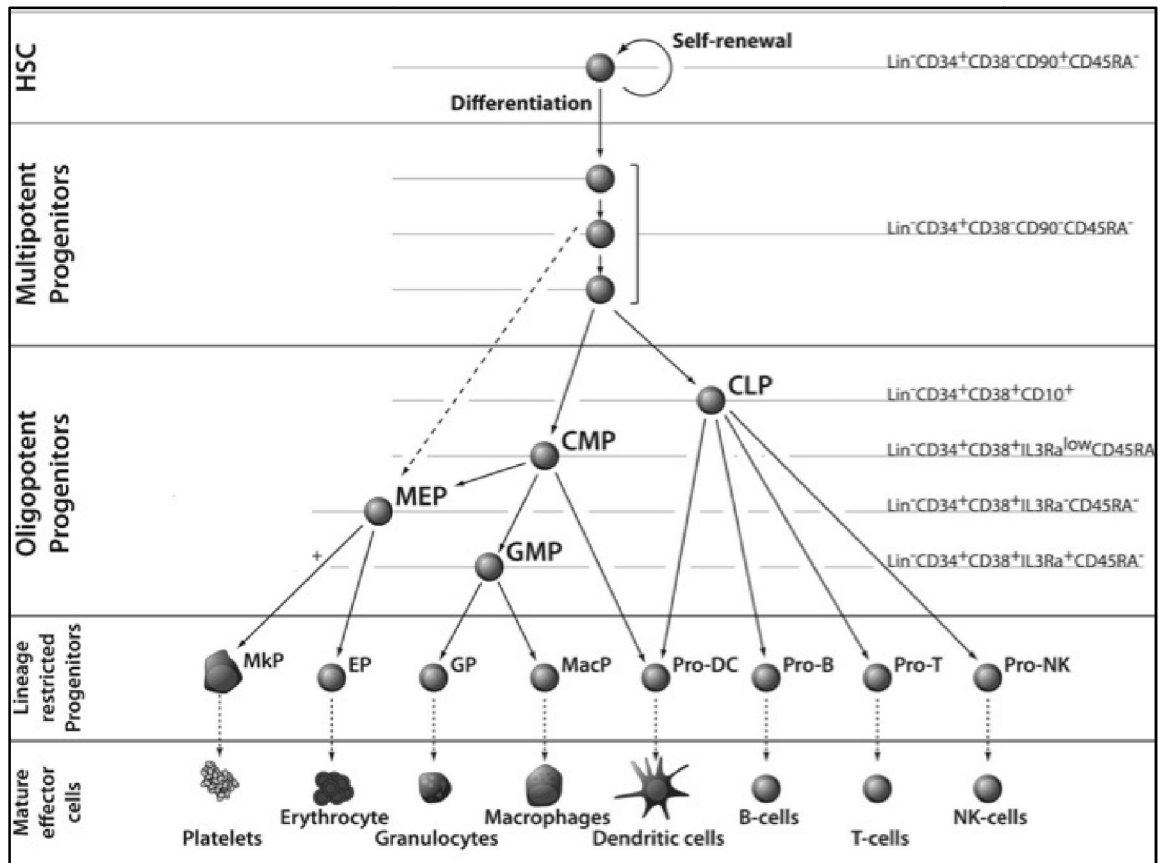


Figura 2. Modelo jerárquico de la hematopoyesis.

2.3 Diferenciación y maduración celular

Puesto a que el número total de HSC del organismo normalmente permanece constante, una proporción de células hijas debe someterse a diferenciación y convertirse así a tipos celulares maduros. La diferenciación celular consiste en una secuencia de hechos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, los que le confieren potencialidad para determinada función, por otra parte; la maduración es la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula (Seita y Weissman, 2010). Estos procesos se desarrollan a través de una serie de eventos en donde grupos alternados de genes determinan el destino celular; entre los principales genes involucrados en la diferenciación hacia el linaje mieloide se

encuentran: PU.1, Hox, C/EBP α , C/EBP β y C/EBP ϵ , RUNX1 y SCL (Mayani et al., 2007). Altos niveles de expresión de PU.1 se asocian con la diferenciación granulocítica, mientras que su baja expresión se asocia hacia el linaje eritroide. PU.1, junto con los factores de transcripción GATA-1, GATA-2 y FOG-1, son esenciales para la maduración y diferenciación eritroide y megacariocítica (Valledor et al., 1998) (Figura 3).

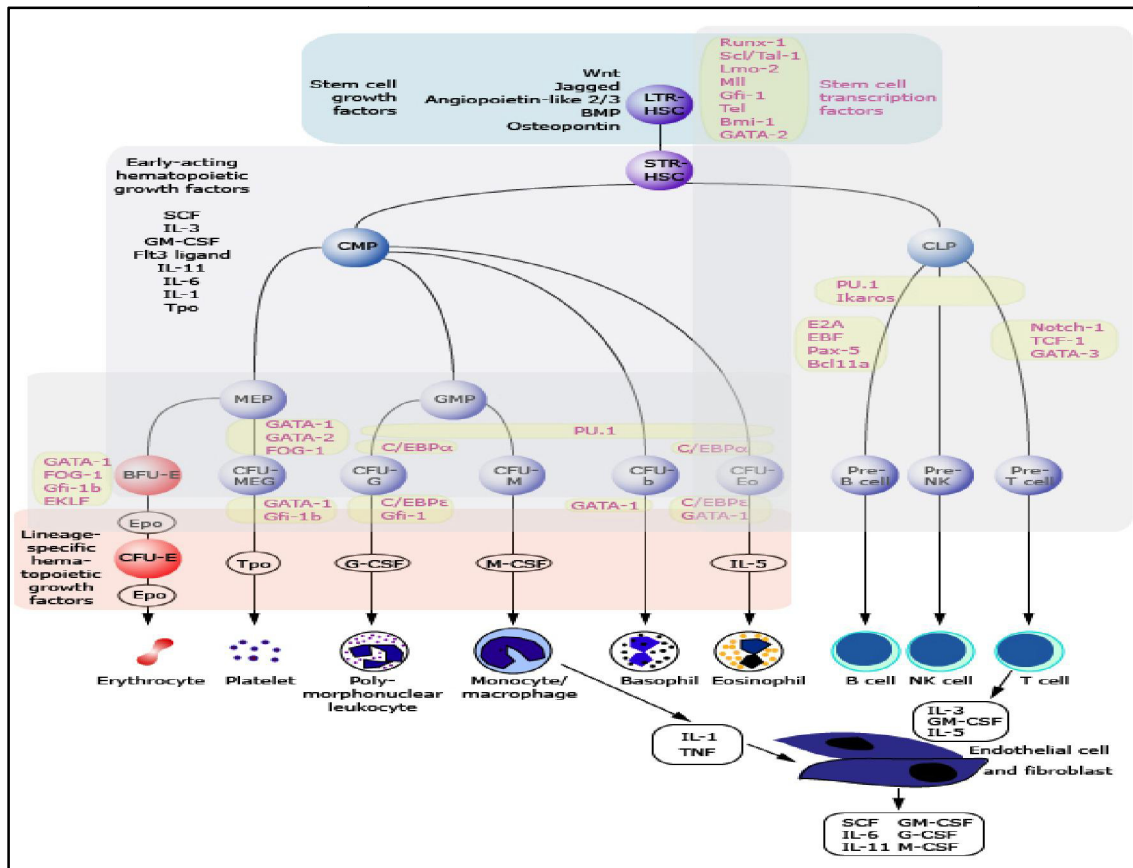


Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular.

2.4 Citocinas involucradas en la hematopoyesis y en la respuesta inmunológica

La diferenciación y maduración celular, no solo depende de la activación de factores de transcripción, la participación de diversas proteínas secretadas, denominadas citocinas, generadas durante las respuestas inmunitarias innatas y

adaptativas estimulan el crecimiento, la diferenciación de células progenitoras de la médula ósea, presentación de antígenos, reclutamiento, activación celular y expresión de moléculas de adhesión las cuales regulan el tráfico celular y determinan la naturaleza de la respuesta inmunológica. Una cascada de fenómenos pueden ser generadas y conjuntos de citocinas pueden actuar en sinergismo para desencadenar respuestas específicas. Cada citocina puede desarrollar diferentes funciones en base al origen celular, hacia la célula blanco que actúe y la fase específica de la respuesta inmune en la que se presente. La clasificación de las citocinas ha sido dada en base al potencial pro-inflamatorio y anti-inflamatorio; esta actividad dependerá de la células inmunológicas presentes y de su estado de respuesta hacia determinada citocina (Abbas et al., 2008).

Las citocinas derivadas de células fagocíticas mononucleares y otras células presentadoras de antígenos (APC) son particularmente efectivas en la promoción del infiltrado celular y daño a tejido residente característico de la inflamación. Los monocitos se activan potentemente para producir citocinas, utilizando receptores de patrón de reconocimiento que reconocen componentes estereotípicos de patógenos que no se producen en las células normales de los mamíferos. Estos receptores, como el receptor de lipopolisacárido (LPS), contribuye a la capacidad del sistema inmune para distinguir patógenos de las proteínas no patógenas a los que el sistema inmunológico está expuesto. Las citocinas predominantemente producidas por los monocitos incluyen TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23 (Abbas et al., 2008).

2.5 Factor de necrosis tumoral (TNF- α)

TNF representa dos proteínas homólogas derivadas de fagocitos mononucleares (TNF- α) y linfocitos (TNF- β). Neutrófilos, linfocitos, células NK y células endoteliales son productores de esta citocina. TNF induce actividad antitumoral mediante efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales e interactúa con células endoteliales para inducir moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1),

moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1) y E-selectina, que permite la entrada de granulocitos hacia el sitio de inflamación. TNF es un potente activador de neutrófilos, mediador de la adherencia, quimiotaxis, degranulación y estallido respiratorio (Borish y Steinke, 2003).

2.6 Interleucina-1 (IL-1)

IL-1 es producida por células del linaje fagocítico mononuclear pero es también producido por células endoteliales, queratinocitos, células sinoviales, osteoblastos, neutrófilos, células gliales. La producción de IL-1 puede ser estimulada por varios agentes incluidas endotoxinas, citocinas como TNF, microorganismos y antígenos. Una de las principales actividades biológicas de IL-1 es la capacidad para activar linfocitos T mediante el potenciamiento de la producción de IL-2 y la expresión del IL-2R. Cuando se secreta IL-1 en concentraciones bajas, IL-1 actúa como un mediador de la inflamación local. Actúa sobre las células endoteliales para aumentar la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión de leucocitos, como los ligandos de las integrinas. Sin embargo, cuando se secreta en grandes cantidades, IL-1 entra al torrente sanguíneo y produce efectos endocrinos. La IL-1 sistémica comparte con el TNF la capacidad para originar fiebre, inducir la síntesis de proteínas plasmáticas de fase aguda por el hígado e iniciar la caquexia. Las similitudes entre las acciones de IL-1 y TNF son sorprendentes a pesar de que sus receptores presentan estructuras diferentes. La probable explicación de estos efectos semejantes es que los receptores de las dos citocinas producen señales mediante proteínas homólogas y activan los mismos factores de transcripción. No obstante, hay varias diferencias entre IL-1 y TNF. IL-1 no induce la muerte apoptótica de las células e incluso en concentraciones sistémicas elevadas. Los fagocitos mononucleares sintetizan un inhibidor natural de IL-1 que tienen una estructura homóloga a la citocinas y que se une a los mismos receptores, pero carece de actividad biológica, de forma que actúa como un inhibidor competitivo de IL-1 y se le denomina antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Borish y Steinke, 2003).

2.7 Interleucina-6 (IL-6)

Las actividades principales de IL-6 incluyen su acción sinérgica con IL-1 y TNF- α para promover la activación de células T mediante APC; induciendo respuesta de fase aguda; replicación, diferenciación y producción de inmunoglobulinas y la promoción de la hematopoyesis y trombopoyesis. Los estímulos que inducen su expresión incluyen TNF- α , IL-1 y agentes que activan linfocitos o macrófagos (Parslow et al, 2003). Las células fagocíticas mononucleares son el principal origen de IL-6, sin embargo, también es sintetizada por células endoteliales, fibroblastos y otras células en respuesta a microorganismos y otras citocinas, principalmente IL-1 y TNF. IL-6 ejerce diversas acciones. En la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y contribuye a los efectos sistémicos de la inflamación. IL-6 estimula la producción de neutrófilos a partir de sus progenitores en la médula ósea, habitualmente en coordinación con factores estimuladores de colonias, IL-6 finaliza la cascada de inflamación e inhibe IL-1, estimulando la síntesis de IL-1Ra (Abbas et al, 2008).

2.8 Quimiocinas

Las quimiocinas fueron descubiertas desde 1960 como polipéptidos de bajo peso molecular (8 a 12 kDa) y se creía que su función era hormonal, no fue hasta la década de los noventa cuando se acuña el nombre de “quimiocinas” por tener una función quimiotáctica sobre una variedad de células incluyendo neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos, fibroblastos y queratinocitos y ser parte de la familia de las citocinas (Navarrete, 2000).

Originalmente, las quimiocinas se describieron como inflamatorias, ya que se producen en el sitio de infección o en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio. Las quimiocinas inflamatorias reclutan y activan los leucocitos para montar una respuesta inmune e inician la cicatrización de heridas. Estas funciones están involucradas en la respuesta inmune adaptativa entre ellos el tráfico de linfocitos,

hematopoyesis, muestreo de antígeno en tejido linfóide secundario y la vigilancia inmunológica.

2.9 Actividades biológicas de las quimiocinas

Las propiedades biológicas de las quimiocinas están regidas en base a las condiciones bajo las cuales son secretadas, por el receptor al que se unen y por las células donde esos receptores se expresan. La mayoría de las quimiocinas se pueden asignar a una de dos amplias categorías funcionales. Las quimiocinas pro-inflamatorias se producen durante el curso de reacciones inflamatorias o inmunes y sirven para movilizar las defensas del huésped; por otra parte las quimiocinas homeostáticas o del desarrollo, se producen casi de manera continua y contribuyen a guiar el desarrollo, mantener la homeostasis o dirigir el tráfico de células circulantes en los tejidos normales.

2.10 Clasificación de las quimiocinas

Las quimiocinas se agrupan en cuatro familias con distintas actividades biológicas y se clasifican dependiendo de la relación entre los residuos conservados del aminoácido cisteína y otros aminoácidos en la región amino terminal, formando dominios CXC (cisteína- aminoácido-cisteína). Se caracterizan por la presencia de tres o cuatro residuos de cisteína conservados. Ellas pueden ser subdivididas en cuatro familias, basado en el posicionamiento de los residuos N-terminal cisteína. La subfamilia C-X-C es caracterizada por la separación de las dos primeras cisteínas por un aminoácido variable. En la subfamilia C-C, los residuos de cisteína son adyacentes entre sí. La mayor parte de las citocinas se ubican dentro de estas dos familias. Además estos grupos se distinguen por la célula blanco primaria: la subfamilia C-X-C se dirige principalmente a neutrófilos y la familia C-C hacia monocitos y células T. Una nueva familia de quimiocinas ha sido identificada la cual carece de la primera y tercera cisteína, conteniendo un residuo único de

cisteína en la posición conservada, ha sido denominada subfamilia C. Una cuarta subfamilia (CX3C) ha sido identificada en la cual dos residuos de cisteína N-terminal están separadas por tres aminoácidos variables.

1. Familia CXC

Esta familia esta codificada en un gen localizado en la región cromosómica 14q 12-21 y se caracteriza por la presencia de un residuo de aminoácido separando los dos residuos conservados de cisteínas. Esta familia se subdivide en dos: las quimiocinas con un grupo de glutamato-leucina-arginina denominado ERL (subfamilia CXC ERL) y las que no lo presentan (subfamilia CXC no ERL).

La subfamilia CXC ERL está constituida por los siguientes integrantes:

- Interleucina-8 (IL-8): su función principal es la atracción de neutrófilos y se produce en monocitos, linfocitos T, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y neutrófilos. Su estructura es de 72 aminoácidos y existe una variante de 77 aminoácidos denominada IL-8 endotelial debido a que se sintetiza en estas células y su función principal es atraer neutrófilos que se fijan al endotelio para el inicio de la diapédesis. Además puede atraer linfocitos T, queratinocitos, basófilos y posee actividad angiogénica (Navarrete, 2000). Es el principal quimioattractante para células prolimorfonucleares y neutrófilos, su síntesis puede ser inducida por LPS, IL-1, TNF y virus, estimula la degranulación de neutrófilos, el estallido respiratorio y la adherencia a células endoteliales por CD11b/CD18. Durante la respuesta inflamatoria, CXCL8 aparece relativamente después en comparación con otros quimioattractantes, por ejemplo leucotrieno B₄ (LTB₄) aparece dentro de los primeros minutos de la activación celular y su concentración permanece a las 3 horas, luego declina y la síntesis de CXCL8 comienza a secretarse y persiste por lo menos 24 horas. Otros miembros de la familia de las quimiocinas, incluyendo CCL3 (MIP-1 α) comparte esta capacidad para activar PMNs (Borish y Steinke, 2003).

La subfamilia CXC no ERL integra a las siguientes moléculas:

- IP-10 (Proteína inducible de interferón): Su función es inhibir la angiogénesis y tiene poca capacidad para atraer neutrófilos.
- MIG (Proteína inducible de interferón gamma de macrófagos): Tiene actividad quimiotáctica para linfocitos T infiltrantes.

2. Familia CC

Se caracterizan por no tener aminoácidos entre las dos cisteínas en su región terminal y está constituida por los siguientes tipos de quimiocinas:

- MCP 1, 2, 3, 4 (Proteínas quimiotácticas de monocitos): La función principal de estas cuatro quimiocinas es atraer monocitos. MCP-1 induce la expresión de integrinas y tiene función quimiotáctica para linfocitos T, linfocitos B, basófilos y células NK. MCP 2 y 3 pueden atraer eosinófilos, función para la que es más potente MCP-4. Actúan a través del receptor CCR2, son reguladores importantes de la función monocítica, puesto que ratones que carecen de los genes ya sea para MCP o CCR2 muestran una quimiotaxis monocítica defectuosa o una mayor susceptibilidad a infecciones. Las MCP y las proteínas relacionadas con ellas también atraen y activan eosinófilos, basófilos y células cebadas (o mastocitos), los cuales son células efectoras clave en las reacciones alérgicas (Parslow et al., 2003).
- RANTES (Secretada y expresada por células T normales y reguladas): Es la quimiocina más potente para la quimiotaxis de eosinófilos aunque también puede atraer linfocitos CD4 y CD45RO así como basófilos, células NK, células dendríticas, mastocitos y monocitos (Navarrete, 2000).

3. Familia C

Sólo se conoce una quimiocina perteneciente a esta familia y se denomina linfotoxina y es relativamente específica para linfocitos.

4. Familia CXXXC

Esta familia se caracteriza por tener tres aminoácidos entre sus residuos de cisteína. La quimiocina denominada fractalquina puede existir como una glicoproteína unida a la membrana plasmática de las células endoteliales promoviendo la adhesión de monocitos y células T o como una forma soluble con una importante actividad quimiotáctica para los mismos tipos celulares.

Por lo que alteraciones tanto en la regulación de factores de transcripción y en la producción de citocinas pueden conducir al desarrollo de eventos patológicos que rompen el balance homeostático entre la renovación de las células hematopoyéticas maduras y su reposición por HSC y células progenitoras, desencadenando una proliferación celular desregulada aumentando la producción de células progenitoras/maduras, o adquiriendo características de auto-renovación desarrollando malignidades hematológicas, como lo son las leucemias (Warr et al., 2011).

2.11 Leucemias

Durante el 2010 en México, se reportaron 33 mil 019 casos hospitalarios por tumores malignos, en la población menor a los 20 años, el 56.7% se presentó en órganos hematopoyéticos (Tabla 1), siendo la leucemia la principal causa de defunción en el 2011, afectando principalmente al género masculino (Tabla 2), datos según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013).

Principales tumores malignos	Grupo quinquenal de edad							
	0 a 4		5 a 9		10 a 14		15 a 19	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Órganos hematopoyéticos	50.93	41.67	65.52	57.89	43.95	34.16	28.60	21.16
Tejido linfático y afines	4.11	2.34	10.55	2.85	8.94	5.19	8.28	5.03
Encéfalo y otras partes del sistema nervioso central	5.89	4.96	6.33	5.99	6.35	4.43	2.64	1.67
Hueso y de los cartílagos articulares	1.91	0.85	2.91	2.55	6.35	9.87	8.51	4.87
Células germinales (testículos, ovarios)	2.92	0.21	0.77	0.75	1.21	3.06	9.42	3.89
Vías urinarias	5.57	5.19	2.89	2.33	0.40	0.48	0.33	0.36
Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C40-C41, C46, C56, C62, C64-C68, C70-C72, C81-C85, C88-C95 y C96.								
Fuente: SSA (2011). <i>Base de egresos hospitalarios 2010</i> ; e INEGI (2011). <i>Censo de Población y Vivienda 2010. Cubos dinámicos</i> . Procesó INEGI.								

Tabla 1. Morbilidad hospitalaria de la población mexicana.

Principales tumores malignos	Grupo quinquenal de edad							
	0 a 4		5 a 9		10 a 14		15 a 19	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Órganos hematopoyéticos	2.24	2.29	2.71	2.50	2.20	2.31	4.25	2.84
Tejido linfático y afines	0.14	0.09	0.31	0.18	0.33	0.34	0.85	0.47
Encéfalo y otras partes del sistema nervioso central	0.81	0.79	0.83	0.94	0.71	0.29	0.47	0.42
Hueso y de los cartílagos articulares	0.05	0.07	0.17	0.20	0.31	0.59	0.79	0.61
Órganos digestivos	0.30	0.13	0.16	0.18	0.07	0.05	0.41	0.23
Vías urinarias	0.23	0.29	0.12	0.15	0.05	0.05	0.07	0.05
Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), C15-C26, C40-C41, C46, C64-C68, C70-C72, C81-C85, C88-C95 y C96.								
Fuente: INEGI (2012). <i>Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos</i> ; y CONAPO (2012). <i>Proyecciones de la Población de México 2010-2050</i> . Procesó INEGI.								

Tabla 2. Mortalidad por tumores malignos.

Las leucemias son enfermedades iniciadas en las HSC o células progenitoras, la cual es caracterizada por un incremento en el número de células sanguíneas. La anormalidad de las células leucémicas es la inhibición de la diferenciación e incremento en la tasa de proliferación (Gocek y Marcinkowska, 2011). En las leucemias el bloqueo de la diferenciación ocurre en progenitores hematopoyéticos tempranos, resultando en células indiferenciadas denominadas blastos. Las cuales sufren eventos transformantes generando células madre leucémicas (LSC) que son capaces de auto-renovarse, propagando e incrementando la progenie celular

(Gómez y Tarín, 2011). Dependiendo de la etapa de la enfermedad (crónica o aguda) su inmunofenotipo (mieloide o linfoide) y la naturaleza de los eventos transformantes como factores remodeladores de la cromatina, fusión de genes así como la activación de tirosina quinasas como BCR/ABL se realiza su clasificación (Morales et al., 2010). La leucemia es dividida en aguda y crónica, y subdividida en linfoide y mieloide (Gocek y Marcinkowska, 2011).

2.12 Clasificación de las leucemias

❖ Según la velocidad de progresión:

Leucemia aguda:

Es un desorden hematopoyético clonal derivado de HSC o células progenitoras comprometidas a un linaje, caracterizada por una predominancia de formas inmaduras o blásticas que mantienen su capacidad de proliferación, estas células no maduran ni mueren como las células normales, por lo que se acumulan y sobrepasan la producción de células normales así que la enfermedad empeora en corto tiempo. Su incidencia es de aproximadamente de 3,7 por 100 000 personas por año, es más alta en hombres que en mujeres (proporción de 4,6:3,0). La incidencia aumenta con la edad: es de 1,9/100 000 en individuos menores de 65 años y de 18,6 por 100 000 en los mayores de esa edad (Gómez y Tarín, 2011).

Leucemia crónica:

La incidencia es de 1,5 por 100 000 personas por año, y la incidencia es más alta en hombres que en mujeres (2,0:1,2). La cual aumenta lentamente con la edad hasta mediados de los cuarenta, a partir del cual empieza a aumentar rápidamente. Este tipo de leucemia involucra células sanguíneas maduras, que proliferan o se acumulan lentamente y pueden funcionar normalmente por un tiempo. Algunas formas de leucemia crónica inicialmente no producen síntomas y

pueden pasar inadvertidas o no diagnosticadas por años. Aunque el tiempo de evolución sea lento, la enfermedad suele ser mortal (Gómez y Tarín, 2011).

❖ Según el tipo de células afectadas

Leucemia linfocítica: afecta células linfoides que forman el tejido linfático.

Leucemia mieloide o mielógena: afecta las células mieloides que incluyen: eritrocitos, leucocitos y megacariocitos (Figura 4).

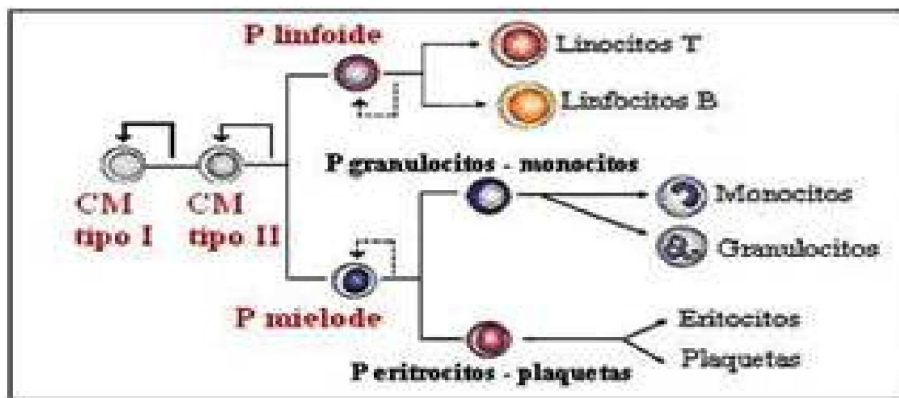


Figura 4. Tipos celulares afectados en base al progenitor transformado.

CM I: Célula madre hematopoyética pluripotencial, CM II: progenitores multipotentes, P. Linfoide: precursor linfoide, P. mieloide: precursor mieloide.

Tomando en cuenta tanto la velocidad de progresión de la enfermedad y el tipo de células afectadas, se han clasificado cuatro tipos de leucemias:

a) Leucemia mielógena aguda (LMA): es el tipo de leucemia más común, ocurre en niños y en adultos, también es llamada leucemia aguda no linfocítica.

b) Leucemia linfocítica aguda (LLA): el tipo de leucemia más común en niños jóvenes, representa el 75% de las leucemias de la niñez.

c) Leucemia linfocítica crónica (LLC): común en adultos, judíos, descendientes de rusos y en Europa oriental.

d) Leucemia mielogénica crónica (LMC): afecta principalmente a los adultos, y se asocia a una anormalidad cromosómica llamada cromosoma Filadelfia, el cual da lugar a la aparición de un gen anormal llamado BCR-ABL, para fines de este proyecto de investigación, se detallará más acerca de este tipo de leucemia (Gómez y Tarín, 2011).

2.13 Leucemia mielógena crónica (LMC)

Historia y epidemiología

En 1845 fue identificada la leucemia mielógena crónica (LMC), pero no fue hasta 1960 cuando se describió la translocación entre los brazos largos del cromosoma 9 y el 22 denominado cromosoma Filadelfia, descubierto por Nowell y Hungerford. Presenta un promedio de aparición entre los 45 a los 55 años de edad, con menos del 10% de los casos en menores de 20 años, con una proporción de 1,4:1 hombre–mujer, respectivamente. Este tipo de leucemia representa entre el 15-20 % de todas las leucemias (tercera más común) con una incidencia de 1 a 2 casos por cada 100 000 adultos. Aproximadamente el 75% de los fallecimientos por esta causa corresponden a adultos mayores de 55 años (Clarkson et al., 2003).

2.14 Cromosoma Filadelfia (Ph)

La LMC es un desorden mieloproliferativo, con un compromiso clonal de las HSC común a las 3 series hematopoyéticas, definida por la actividad constitutiva de una tirosina quinasa, por la presencia de una mutación BCR-ABL conocida también como cromosoma Filadelfia (denominada así debido a que existe una translocación recíproca entre el gen Abelson Tk “ABL” gen del cromosoma 9 que se fusiona con la región de ruptura de los conglomerados (breakpoint cluster región) del gen BCR del cromosoma 22), el 95 % de las leucemias mielógenas

crónicas son causadas por esta anomalía genética (Beligory et al., 2008) (Figura 5).

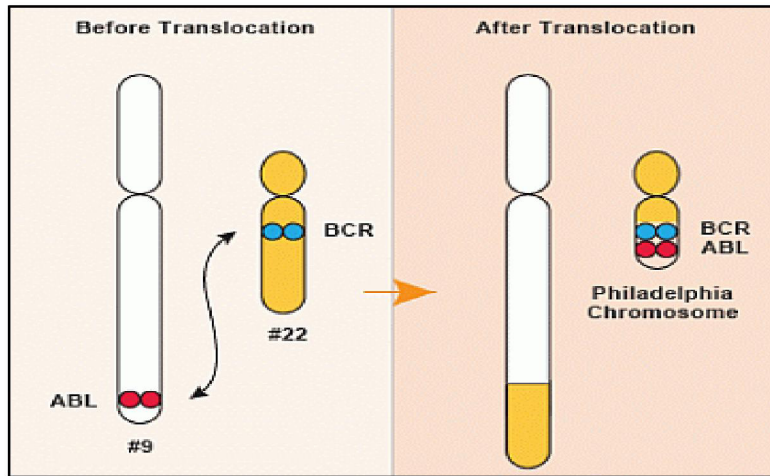


Figura 5. Principal translocación cromosómica presente en la LMC.

Con la translocación recíproca del cromosoma Filadelfia se crean dos genes: BCR-ABL del brazo largo del cromosoma 22 (Cromosoma Filadelfia) expresado en la mayoría de los pacientes con LMC, y ABL-BCR del brazo largo del cromosoma 9 que se encuentra sólo en el 70 % de los casos. Esta translocación codifica una proteína que varía de tamaño dependiendo del sitio de ruptura del gen BCR. Los tamaños varían entre 190 KDa (70 %) y 230 KDa (30 %), siendo esta última responsable de la mayoría de las anomalías fenotípicas en la fase crónica. Esta proteína presenta actividad tirosina quinasa; los pacientes que la expresan muestran mejores respuestas a los tratamientos de primera línea, mientras que los pacientes que poseen la proteína de 190 KDa son más propensos al desarrollo de farmacoresistencia. Estas proteínas también se pueden encontrar en pacientes con leucemia linfocítica aguda con una menor prevalencia, lo que explica que no todos los pacientes con cromosoma Filadelfia desarrollarán la LMC (Weerkamp et al., 2009).

2.15 Efectos de la oncoproteína BCR-ABL

Esta alteración en la proteína ABL favorece la proliferación, conduce a la resistencia apoptótica y bloquea la diferenciación celular, cabe aclarar que todas las personas presentan una proteína ABL, y lo que expresan los pacientes con LMC es la fusión BCR-ABL. El resultado de esta translocación es la unión de una actividad enzimática tirosina quinasa aportada por la proteína ABL que posee un sitio de unión al ATP y sus sustratos. Normalmente la tirosina quinasa generada por el ABL se mantiene inactiva y es activada por señales intracelulares. En los pacientes con enfermedad oncogénica puede ocurrir una fusión entre el sitio tirosina quinasa con su proteína, lo cual favorece la auto-fosforilación permitiendo crear sitios de unión anómalos para proteínas, logrando ser independientes de ligando lo que explicaría su actividad continua (Figura 6).

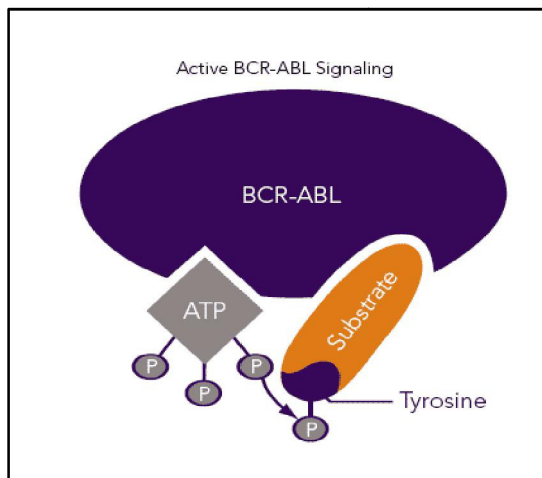


Figura 6. Regulación de la oncoproteína Bcr-Abl.

Normalmente la proteína ABL es pro-apoptótica y se encuentra en el núcleo y en citoplasma, mientras que el BCR-ABL es anti-apoptótico y no se encuentra en el núcleo, esta oncoproteína aunque es fundamental en el diagnóstico de la LMC, no es la causa principal de la transformación de la LMC ya que se ha logrado detectar la expresión de este gen en pacientes no enfermos, lo que indica que existen otros factores desconocidos que conducen hacia la transformación celular (Clarkson et al., 2003).

2.16 Evolución clínica de la LMC

Este padecimiento cursa por estadios bifásicos o trifásicos (fase crónica, acelerada o blástica). La fase crónica tiene una duración variable, con una media entre cuatro y seis años, se caracteriza por una sobreproducción de células del linaje granulocítico (mieloides inmaduras y granulocitos maduros), con aumento en el recuento de leucocitos y plaquetas, y un conteo de células blásticas menores al 10 % (Figura 7). Estas características hacen que no sea fácil diferenciarla clínica y hematológicamente de una leucemia aguda.

Dentro de la sintomatología se presenta en los pacientes fatiga, palidez, distensión abdominal, esplenomegalia, hepatomegalia, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso sin causa aparente. Cerca del 85 % de los pacientes con LMC se encontrarán en fase crónica al momento de ser diagnosticados, que es una fase inicial, estable y benigna (Beligory et al., 2008).

La fase acelerada, la cual no todos los pacientes la presentan, ya que pueden pasar de una fase crónica a una fase blástica, viéndose en cada dos de tres pacientes. Se presenta con una duración aproximada de 18 meses, aunque en algunos casos existe una rápida progresión hacia la fase blástica de solo seis meses. Esta fase acelerada presenta una menor respuesta al tratamiento y sus características son una intensa esplenomegalia, leucocitosis, incremento de los blastos del 10 al 30 % en sangre periférica y médula ósea, un incremento de los basófilos del 20% en sangre periférica.

Posteriormente se desarrolla la fase blástica, en la cual se presenta una sobrevida alrededor de dos a cuatro meses, tiene un curso fatal y se presenta un 30 % o más de células blásticas en médula ósea (Figura 7), las cuales no ejercen ningún efecto en las respuestas inmunológicas de los pacientes, por lo que su sistema inmune se deteriora. Estos pacientes son los más resistentes al tratamiento y la fase blástica puede presentarse como una enfermedad mieloide o linfoide. El

paciente puede presentar fiebre, dolor, pérdida de peso y aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos, hígado o bazo. Tanto la fase acelerada, como la fase blástica son consideradas fases avanzadas, y el 15 % de los pacientes con LMC en el momento de ser diagnosticados se encontrarán en una de estas fases (Gómez y Tarín, 2011).

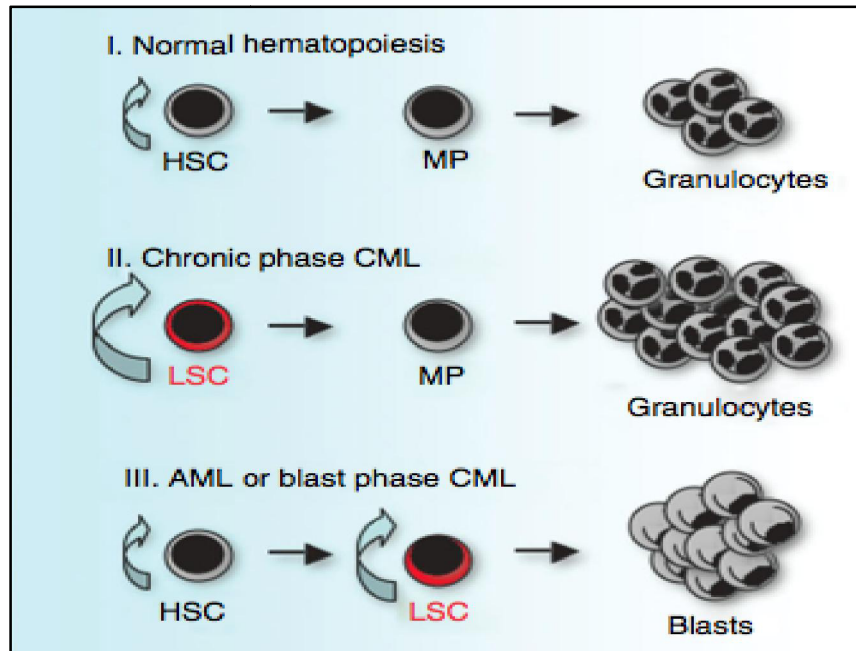


Figura 7. Evolución de la LMC.

2.17 Tratamiento

Dentro de las estrategias generadas para contrarrestar el avance de la enfermedad se buscan agentes que puedan disminuir la actividad tirosina quinasa, que como se mencionó anteriormente se expresa de manera constitutiva en la LMC, lo que llevó a diseñar medicamentos que lograron inhibir esta actividad catalítica por el bloqueo de sitio de unión del ATP o sustratos, bloqueando su dimerización, generando anticuerpos contra el receptor tirosina quinasa o contra el ligando, con la finalidad de disminuir su actividad tirosina quinasa, a continuación

se describirán las principales farmacoterapias para el tratamiento de la LMC (Morales et al., 2010).

2.18 Interferón alfa (IFN- α)

Fue de los primeros tratamientos utilizados en la clínica para evitar la evolución de esta enfermedad, logró una respuesta citogenética completa del 5 al 20 % en las fases crónicas tempranas en pacientes con LMC, pero con una marcada toxicidad y una disminución de su eficacia directamente proporcional al tiempo de duración de la fase crónica (Gómez y Tarín, 2011).

2.19 Imatinib

Actualmente, el tratamiento inicial estándar para la LMC en la fase crónica es el mesilato de imatinib, (aprobado por la FDA, 2001) potente inhibidor de la tirosina quinasa Bcr-Abl. La unión de este fármaco se logra en los sitios de unión de ATP, de la conformación Bcr-Abl quinasa inactivos, logrando una inhibición del crecimiento e induciendo apoptosis en las células que expresan esta conformación (Figura 8 y 9).

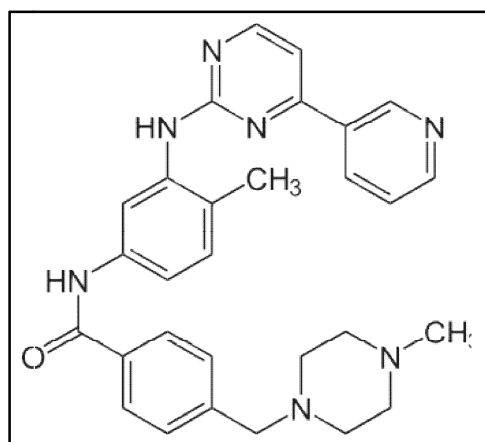


Figura 8. Estructura química del imatinib.

El imatinib, es una farmacoterapia oral eficaz que produce una remisión estable en la mayoría de los pacientes, los estudios han demostrado que el imatinib (Gleevec®) logra mantener controlada la fase crónica en los pacientes con LMC al ingerir una dosis de 400 mg/día, y en fase acelerada y blástica, a una dosis de 600 mg/día cuando ha fallado en estos pacientes el uso del IFN- α . Este medicamento tiene una rápida absorción, logra altas concentraciones luego de dos horas de su administración, tiene un metabolismo hepático, a través del citocromo P450 e isoforma CYP 3A4. El objetivo del tratamiento con el imatinib es encontrar una respuesta hematológica completa (reducción en el recuento de leucocitos, plaquetas, células inmaduras como mielocitos, promielocitos, o blastos en sangre periférica, desaparición de esplenomegalia) a los tres meses de seguimiento (Beligory et al., 2008).

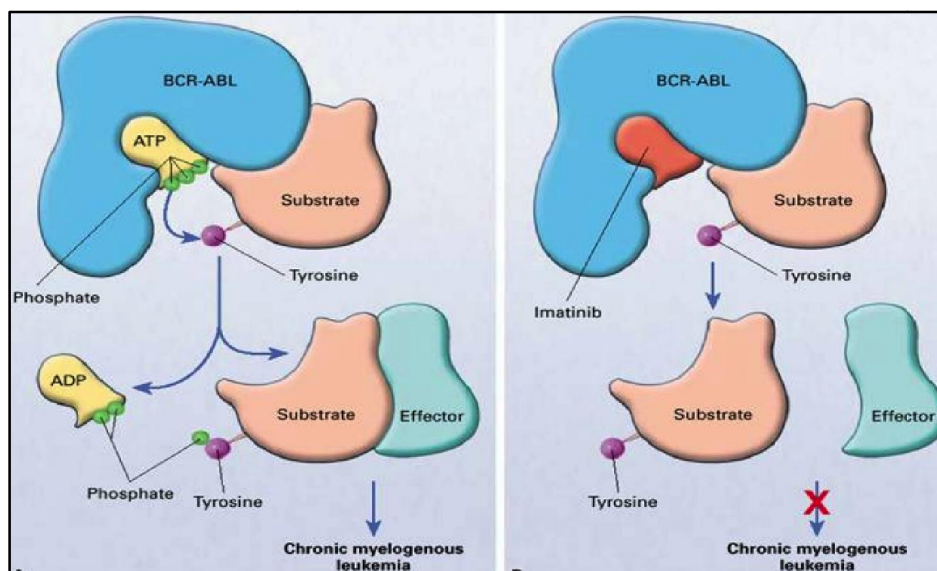


Figura 9. Mecanismo de acción del imatinib.

A pesar que el imatinib es un tratamiento efectivo, algunos pacientes recaen por enfermedad resistente, hasta en un 25% de los casos. La resistencia puede ser primaria o secundaria. La resistencia primaria es la falta de respuesta inicial al no alcanzar los objetivos del tratamiento y la secundaria ocurre cuando sobreviene

una recaída del paciente que inicialmente había tenido una respuesta (Yin L et al., 2010).

2.20 Mecanismos de resistencia al imatinib

Entre los mecanismos relacionados con la resistencia se encuentran los siguientes aspectos:

- Efectos farmacocinéticos, donde juegue un papel su mecanismo de absorción, vías de metabolización e interacción con otras drogas y concentraciones plasmáticas.
- La unión a proteínas plasmáticas que disminuiría su biodisponibilidad.
- La absorción intracelular del imatinib, dependerá de la concentración de la proteína transportadora unida a ATP, que es una proteína transmembrana que regula el tránsito de sustancias fuera de la célula, se ha visto implicada en la expulsión de varias drogas antineoplásicas, disminuyendo de esta forma la concentración de la droga a nivel intracelular.
- Sobreexpresión de BCR-ABL, mutaciones puntuales del dominio quinasa del receptor BCR-ABL (mutación T315I) (Gómez y Tarín, 2011).

2.21 Dasatinib

El dasatinib (Figura 10) es la primera terapia autorizada por la FDA como tratamiento de la LMC resistente al imatinib. Es un inhibidor oral del receptor de tirosina quinasa de segunda generación, con excepción de la mutación T315I, el dasatinib es efectivo con el resto de las mutaciones resistentes al tratamiento con imatinib. La inhibición que realiza el dasatinib es sobre las quinasas Bcr-Abl, la familia de SRC (SRC, LCK, YES, FYN), c- KIT, las quinasas del receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR). Es metabolizado a nivel hepático por la citocromo P450 y la isoenzima CYP3A4. El dasatinib se une al sitio de unión del ATP, haciéndolo tanto en las conformaciones activas e inactivas del

dominio quinasa del ABL, además presenta una gran afinidad con los sitios de contacto al ABL comparado con el imatinib (Beligory et al., 2008).

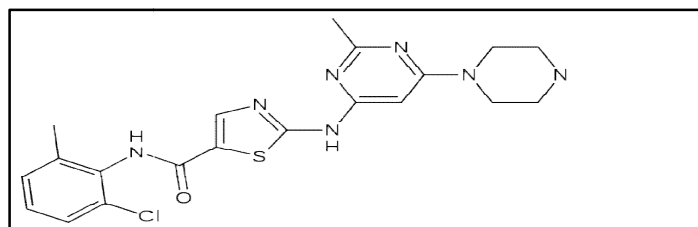


Figura 10. Estructura química del dasatinib.

El efecto adverso más frecuente es la mielosupresión; y el derrame pleural observado en 5 a 35% de los pacientes. Por lo que se interrumpe el tratamiento por periodos cortos para permitir la recuperación del paciente.

2.22 Nilotinib

El nilotinib (Figura 11) es un derivado del imatinib, inhibidor de Bcr-Abl que ha dado buenos resultados en los pacientes con LMC resistentes a imatinib. Es un inhibidor competitivo por el sitio de unión al ATP similar al imatinib, aunque 60 veces mas potente que éste. Está indicado para pacientes en fase crónica o acelerada resistentes al imatinib, con una dosis recomendada de 400 mg/dos veces al día, por vía oral. Es inactivo contra la mutación T315I, y su metabolismo es vía citocromo P450 (Beligory et al., 2008).

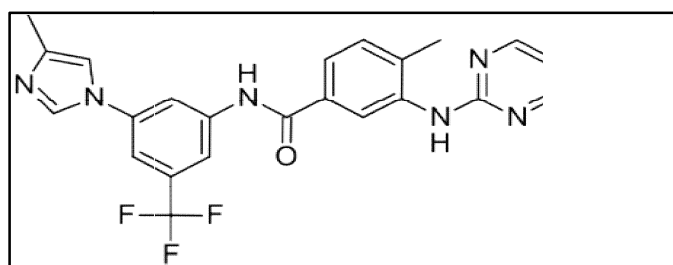


Figura 11. Estructura química del nilotinib.

2.23 Otros fármacos y modalidades en la terapia contra LMC

AP23464 es un inhibidor dual sobre SRC-ABL quinasa, el cual previene la proliferación, bloquea la progresión del ciclo celular y promueve la apoptosis de células de LMC, sin embargo; es inactiva contra la mutación T315I.

MK-406 es un inhibidor de aurora quinasa con actividad contra el BCR-ABL el cual inhibe la auto-fosforilación de la mutación T315I, por lo que algunos pacientes con esta mutación han mostrado mejoría tras el tratamiento generando la inhibición de la proliferación de las células de LMC.

Por otro lado, el trasplante de células hematopoyéticas es una opción curativa que había sido el tratamiento de elección antes de la aparición de los inhibidores de las tirosinas quinasas. Sin embargo; la morbilidad y mortalidad del trasplante lo han llevado a ser la segunda línea de tratamiento ya que la probabilidad de muerte relacionada con el trasplante mieloablatoivo de células hematopoyéticas es del 20 y 40% (Clarkson et al., 2003).

2.24 Nuevas estrategias terapéuticas relacionadas con la inducción de la diferenciación celular

Alteraciones genéticas como translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales, amplificaciones o deleciones genéticas bloquean el programa normal de la diferenciación (Mata-Greenwood et al., 2002) ocasionando que los progenitores hematopoyéticos, aberrantes no respondan a las señales de diferenciación en médula ósea (Fialkow et al., 1981) proliferando rápidamente y causando un incremento en los recuentos de células blancas pero con funciones inmunológicas deficientes y que, además no desarrollan apoptosis (Domen, 2000), son factores cruciales en la patogénesis de las leucemias.

El actual tratamiento de la leucemia mielógena crónica es insatisfactoria y la mayoría de los pacientes siguen muriendo de la enfermedad. Varios protocolos de tratamiento con fármacos citotóxicos e interferón han prolongado la vida de los pacientes, pero los protocolos de tratamiento no han resultado en una mejora adicional significativa. El único tratamiento curativo es la quimioterapia y/o irradiación intensiva seguida del trasplante de médula ósea alogénica. Solo una minoría de los pacientes con LMC tienen donantes compatibles adecuados y son elegibles para el trasplante; por el contrario pacientes de edad avanzada que muchas veces tienen otras enfermedades, son incapaces de tolerar la intensiva terapia (Clarkson et al., 2003). Otro de los tratamientos, es el desarrollo de moléculas dirigidas hacia tirosinas quinasas, sin embargo se desarrolla resistencia debido a la heterogeneidad de las células tumorales y a la sobrevivencia de células madre de la LMC quiescentes. Por lo que para superar la resistencia a los fármacos y la recaída a la enfermedad se ha propuesto la terapia de inducción de la diferenciación celular. La terapia de diferenciación está enfocada en el empleo de agentes capaces de inducir la diferenciación terminal hacia un fenotipo maduro acompañado del cese de la proliferación celular con eventual desarrollo de la muerte celular (Alenad et al., 2013). En principio, la diferenciación inducida mejora el estatus inmunológico de los pacientes evitando la lisis masiva de células blásticas observado por regímenes citotóxicos (Gocek y Marcinkowska, 2011), se ha demostrado que una combinación de terapias citotóxicas y de diferenciación puede potenciar la apoptosis de las células tumorales, disminuyendo la recurrencia de los tumores y evitando el desarrollo de resistencia hacia los quimioterapéuticos. La leucemia promielocítica aguda (LPA) fue el primer modelo de malignidad hematológica tratada por agentes inductores de la diferenciación, incluyendo el ácido-retinoico *trans* (ATRA) (Lui y Leung, 2005). El ácido retinoico-*trans* (ATRA) es un potente inductor de la diferenciación en células leucémicas mieloides hacia el linaje granulocítico (Xiang et al., 2014) mostrando remisiones completas en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda sin causar hipoplasia medular (Mata-Greenwood et al., 2002).

ATRA es un ligando de los receptores del ácido retinoico (RARs), el cual comprende una familia de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta (Nowak et al., 2009) las concentraciones farmacológicas de ATRA causan cambios conformacionales de PML-RARA, por lo cual la estructura de la cromatina se relaja, se elimina la represión transcripcional, conduciendo hacia la diferenciación terminal a granulocitos. La degradación de PML-RARA inducida por ATRA es un mecanismo de acción en la terapéutica de la LPA. La degradación de PML-RARA está acompañada por la activación o inhibición de varios genes. Estos incluyen los factores de transcripción (C/EBP o PU.1), factores reguladores de la cromatina, reguladores del ciclo celular así como inhibidores de la síntesis de proteínas (Gocek y Marcinkowska, 2011).

Algunos compuestos distintos del ATRA pueden inducir diferenciación de las células leucémicas humanas *in vitro*, pero la transición de estos resultados a la clínica hasta el momento no han tenido éxito, estas investigaciones se logran mediante el uso de líneas celulares leucémicas humanas las cuales retienen el potencial de diferenciación terminal hacia varios tipos de células maduras al ser estimuladas con diversos compuestos. Tal es el caso de la línea celular K562, su característica primordial es el exhibir marcadores eritroides, monocíticos y megacariocíticos, lo cual sugiere que resulta de la transformación de un precursor hematopoyético. La línea K562 ha sido utilizada como un sistema *in vitro* para el estudio de la diferenciación celular, estudios han indicado que diversos compuestos, con diversidades en su estructura química, pueden inducir diferenciación de las células K562 a concentraciones no tóxicas; agentes como hemina, 5-azacitidina, arabinósido de citosina (ARA-C) conducen la diferenciación hacia el linaje eritroide por el contrario los forboles inducen la diferenciación hacia monocitos y/o megacariocitos (Kang et al., 1996, Zhang y Wong, 2007), sin embargo; los ésteres de forbol promueven la carcinogénesis, por lo que su uso en la clínica no es contemplado. Similarmente, el DMSO induce diferenciación sobre las células de leucemia, incluyendo diferenciación granulocítica en la línea HL-60, pero es un solvente químico inadecuado para el uso interno en humanos. Más prometedor es el uso potencial de la vitamina 1α -25 dihidroxivitamina D₃, y sus

análogos químicamente modificados los cuales inducen diferenciación hacia monocitos en líneas de leucemia sin presentar citotoxicidad. Sin embargo, su uso clínico está limitado por la hipercalcemia sistémica resultante del aumento de la absorción intestinal de calcio y las propiedades movilizadoras de calcio de la vitamina D₃. La inhibición de la diferenciación celular puede resultar no solo de la presencia de proteínas mutadas si no también por cambios epigenéticos como la hipermetilación de DNA o acetilación aberrante de las histonas. Por el contrario, la pérdida de la función genética causada por mutaciones, cambios epigenéticos pueden ser revertidos farmacológicamente vía inhibición de las metiltransferasas del DNA (DnmT) e histonas deacetilasas (HDAC). En las células normales, la acetilación de las histonas y la metilación del DNA se mantiene en equilibrio permitiendo la expresión de genes. En las células leucémicas, este equilibrio se altera, la hipermetilación ocurre y las HDAC se sobreexpresan lo que conduce a una represión de la transcripción de genes involucrados en la diferenciación celular. Algunos inhibidores de HDAC y DnmT han sido desarrollados para el tratamiento de pacientes con malignidades hematológicas, ya sea como monoterapias o en combinación con otros agentes. El tratamiento de las células leucémicas con los inhibidores, resulta en la remodelación de la cromatina que impide el bloqueo de la transcripción de genes que inducen la diferenciación, arresto del ciclo celular, apoptosis o autofagia (Gocek y Marcinkowska, 2011).

Derivados de la piperazina utilizados normalmente como antibióticos o antihelmínticos, recientemente ha demostrado que inhibe la proliferación y conduce a la diferenciación eritroide en la línea celular K562. Por lo que se ha propuesto que líneas celulares de LMC resistentes al imatinib, sean tratadas con inductores de la diferenciación celular, como recientemente se ha demostrado con el uso del resveratrol, causando una diferenciación eritroide (Saab et al., 2013). Ya que se ha visto que pacientes tratados con imatinib siguen expresando la proteína Bcr-Abl a pesar de la inhibición de la actividad quinasa en las células madre/progenitoras de la LMC, estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento secuencial de aclarubicina A (ACM) junto el imatinib disminuye la expresión de los niveles de la proteína Bcr-Abl conduciendo a la apoptosis, desencadenando

también disminución de la expresión de Mcl-1 y Bcl-xL en la línea celular K562, los cuales forman parte de los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2. Mcl-1 ha sido identificado como un blanco dependiente de Bcr-Abl y factor de supervivencia en LMC, y su sobre-regulación ha sido demostrada que juega un papel importante en la resistencia a apoptosis. Otros estudios reportan que la disminución de la expresión de Bcl-xL se encuentra involucrada en la apoptosis de las células K562 (Lee et al., 2013). Con los antecedentes antes mencionados se abre la pauta para el descubrimiento de nuevos agentes con la actividad de diferenciación celular sobre células leucémicas que eviten la proliferación tumoral.

2.25 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable de leucocitos de bovino, el cual posee una mezcla de sustancias de bajo peso molecular, lo que le confiere la capacidad de modificar la respuesta inmunológica del huésped, posee efecto antibacteriano, anti-inflamatorio, antioxidante y antitumoral, estas propiedades han sido determinadas mediante la realización de diferentes protocolos de investigación. En bacterias patógenas de importancia clínica, se ha observado que el tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP conduce a la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, las cuales son causantes de altas tasas de morbilidad y mortalidad (Franco-Molina et al., 2006). En cuanto a las propiedades anti-inflamatorias del IMMUNEPOTENT CRP fueron atribuidas por las siguientes investigaciones; en primera instancia, se realizó una investigación relacionada al efecto *in vitro* sobre macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS, el cual es uno de los modelos ideales para la inducción de el síndrome SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), encontrando que macrófagos peritoneales estimulados con LPS y posteriormente tratados con el IMMUNEPOTENT CRP, modula la producción de ON, y disminuye la producción de TNF- α e IL-6 ocasionada por el LPS (Franco-Molina et al., 2005). Con estas observaciones, posteriormente se realizó el mismo

experimento pero en sangre periférica humana, encontrando resultados similares en los cuales el IMMUNEPOTENT CRP disminuyó la producción de óxido nítrico, TNF- α e IL-6, posteriormente en un modelo *in vivo*, se indujo en ratones Balb/c shock endotóxico mediante la administración de LPS, encontrándose que el IMMUNEPOTENT CRP no previene el shock endotóxico, pero sí mejora la sobrevivencia en un 80 % cuando se administró después de 30 minutos, 4, 8 y 12 h después de haber iniciado el shock endotóxico; en donde los ratones sin tratamiento mueren en un período de 20 – 22 h.

En otro trabajo realizado por el grupo de investigación se determinó *in vitro* en macrófagos humanos (empleando la línea celular U-937, diferenciada con PMA), y posteriormente estimulada con LPS induciendo la producción de agentes inflamatorios que provocan la oxidación celular como el ON, TNF- α , COX-2 y PGD₂, disminuyendo la capacidad de los antioxidantes intercelulares (antioxidante total, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (Gpx), y superóxido dismutasa (SOD)), por el contrario al recibir los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP se logró reducir de manera significativa la producción de los agentes inflamatorios y oxidativos (ON, TNF- α , COX-2, PGD₂) e incrementaban la actividad de antioxidante total, CAT, Gpx, y SOD. A su vez se determinó que el IMMUNEPOTENT CRP disminuye la fosforilación de I κ B, evitando la unión al DNA del factor de transcripción NF κ B el cual está ampliamente involucrado en procesos inflamatorios, siendo una de las principales vías de señalización para la actividad moduladora del IMMUNEPOTENT CRP (Franco-Molina et al., 2011).

Otra de las propiedades del IMMUNEPOTENT CRP, es su actividad antitumoral, mostrando un efecto citotóxico sobre diversas líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, BT-474, MDAMB453), mediante la modulación de la expresión de genes apoptóticos (p53, bag-1, c-myc, bax, bcl-2), pulmón (A427, CALU), linfoma (L5178Y) y melanoma murino (B16F10) mediante la activación de caspasa-3, e *in vivo* en un modelo en el cual ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea con células B16F10, desarrollando tumores palpables e incremento de la producción de VEGF en suero y tumor, posteriormente fueron tratados con el

IMMUNEPOTENT CRP causando una disminución significativa del peso tumoral y producción de VEGF previniendo la metástasis (Franco-Molina et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que ha demostrado efectos citotóxicos en diversas líneas celulares de cáncer, a la fecha se desconoce el efecto del IMMUNEPOTENT CRP en líneas celulares de leucemia humana y su posible efecto como inductor de la diferenciación celular, por lo cual fue de interés en este proyecto de investigación la determinación de los efectos como un potencial agente en la terapia de inducción de la diferenciación celular.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP en la línea de leucemia mielógena crónica humana K562 induce diferenciación y afecta la viabilidad celular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar los efectos citotóxicos y de diferenciación celular del IMMUNEPOTENT CRP en la línea mielógena crónica humana K562.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad en la línea celular K562.
2. Determinar cambios morfológicos en la línea celular K562 tratada con el IMMUNEPOTENT CRP.
3. Evaluar la expresión de marcadores de diferenciación monocítica (CD14⁺, CD68⁺, CD163⁺) y la actividad fagocítica en la línea K562 tratada con IMMUNEPOTENT CRP.
4. Evaluar el efecto de las dosis citotóxicas del IMMUNEPOTENT CRP obtenidas a partir de la línea K562, sobre monocitos humanos y macrófagos peritoneales murinos.
5. Evaluar el efecto de las dosis citotóxicas del IMMUNEPOTENT CRP sobre la línea K562 pre-tratada con el IMMUNEPOTENT CRP a dosis de diferenciación celular.
6. Evaluar la expresión del marcador de superficie CD42a⁺ característico de la diferenciación megacariocítica en la línea K562 tratada con IMMUNEPOTENT CRP.
7. Evaluar los efectos sobre la proliferación y ciclo celular en la línea K562 tratada con IMMUNEPOTENT CRP.

8. Evaluar la producción de óxido nítrico en la línea celular K562 tratada con IMMUNEPOTENT CRP.
9. Evaluar la producción de citocinas y quimiocinas en la línea celular K562 tratada con IMMUNEPOTENT CRP.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México), es una mezcla heterogénea de moléculas de bajo peso molecular (<12kDa), elaborado a partir del homogenizado del bazo de bovinos, dializado, liofilizado y posteriormente sometido a pruebas de esterilidad (inoculación de ratones *in vivo* y determinación de endotoxinas mediante la prueba de *Limulus* del lisado de amebocitos (LAL)), libre de la presencia de pirógenos endógenos y bacterias. Para el ensayo de diferenciación celular, 5 U de IMMUNEPOTENT CRP fueron disueltas en 7 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, (obteniéndose un stock de 0.71 U/mL del IMMUNEPOTENT CRP), del cual se realizaron diluciones para obtener las dosis del IMMUNEPOTENT CRP (0.07, 0.14, 0.21, 0.28 y 0.35 U/mL). En el caso del ensayo de citotoxicidad, 5 U de IMMUNEPOTENT CRP fueron disueltas en 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB, (obteniéndose un stock de 2.5 U/mL), a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las dosis del IMMUNEPOTENT CRP (0.5, 0.75 y 1 U/mL). Un solo lote del IMMUNEPOTENT CRP fue empleado para la realización de todos los experimentos, disuelto en medio de cultivo completo, filtrado para su empleo mediante filtros de 0.2 µm de diámetro (Milipore, USA),

El PMA (Forbol miristato acetato) y el DMSO (dimetil-sulfóxido) se obtuvieron de Sigma Aldrich (Chemical Company, St Louis MO, USA) y fueron reconstituidos en medio RPMI-1640 (GIBCO™, USA) estéril, almacenados a -20°C y 37°C, respectivamente; hasta su empleo, tanto el PMA como el DMSO fueron utilizados como controles positivos inductores de la diferenciación celular en cada uno de los experimentos.

5.2 Líneas celulares

La línea celular K562 fue establecida a partir de efusión pleural de un paciente con leucemia mielogénica crónica en crisis terminal blástica y la línea celular MOLT-3 fue establecida a partir de un paciente con leucemia linfoblástica aguda de células T, las líneas celulares fueron obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA. USA) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado a 56°C durante 30 minutos (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA), conteniendo 3 mL de una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B) (Sigma, Chemical Company, ST. Louis MO, USA), e incubadas en una atmósfera de 37°C, 95% de aire y 5% CO₂.

5.3 Condiciones del cultivo celular y tratamientos

Para determinar la actividad citotóxica y diferenciación celular, 1×10^5 células K562 /mL fueron cultivadas en placas de 6 pozos, posteriormente los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35, 0.5, 0.75 y 1 U/mL), PMA (10ng/mL) y DMSO (1.5% v:v) fueron añadidos e incubados durante 96 h en una atmósfera de 37 °C y 5% CO₂. La línea celular MOLT-3 (leucemia linfoblástica aguda) fue utilizada como un control citotóxico de linaje de células T.

5.4 Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos

Ratones Balb/c de 6 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, para la obtención de macrófagos peritoneales residentes, mediante lavados repetidos y recuperación del medio de cultivo RPMI-1640 estéril y frío dentro de la cavidad peritoneal del ratón, empleando una jeringa con aguja estéril.

Por otra parte, monocitos primarios humanos fueron aislados a partir de sangre periférica de donadores sanos, la sangre fue diluida con PBS 1:1 (v/v) luego, la sangre fue centrifugada en un gradiente de Ficoll-Paque durante 30 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente, se colectó la interfase, la cual consiste de células mononucleares de sangre periférica, fue lavada en tres ocasiones con medio de cultivo. Las células fueron ajustadas a 2×10^6 células/mL, cultivadas durante 3 horas, para permitir la adherencia al plástico, después las células no adherentes fueron descartadas, y las células adherentes fueron obtenidas por tripsinización, y centrifugadas a 1200 rpm y ajustadas a 1×10^5 células/mL y tratadas con IMMUNEPOTENT CRP (0.5, 0.75 y 1 U/mL) e incubadas en una atmósfera de 37 °C y 5% CO₂ durante 96 horas.

5.5 Evaluación de la viabilidad celular sobre K562, MOLT-3, monocitos primarios humanos y macrófagos peritoneales murinos tratados con el IMMUNEPOTENT CRP

Para evaluar la muerte celular, las células K562, MOLT-3, monocitos humanos y macrófagos peritoneales incubados durante 96 horas con los diferentes tratamientos del IMMUNEPOTENT CRP (0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35, 0.5, 0.75 y 1 U/mL), PMA y DMSO fueron colectadas por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos, fueron lavadas con PBS y resuspendidas con 0.2 mL de PBS y 1 µL de yoduro de propidio (50µg/mL, BD Biosciences) fueron añadidos e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad. Finalmente, 10,000 eventos se analizaron mediante el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San José California, USA), el porcentaje de células que logran incorporar el yoduro de propidio es proporcional al porcentaje de células muertas.

5.6 Análisis de proliferación celular mediante azul de tripano

Las células K562 previamente tratadas durante 96 horas con IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron obtenidas, centrifugadas y resuspendidas con PBS, el

porcentaje de proliferación fue estimado por conteo celular mediante azul de tripano, el cual es un método de tinción por exclusión que permite diferenciar células viables de células muertas. Las células viables mantienen la membrana celular intacta por lo cual el azul de tripano no se incorpora; por el contrario, si atraviesa la membrana de las células muertas, observándose un distintivo color azul bajo el microscopio. Por otro lado, para evaluar la capacidad proliferativa de las células previamente tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO durante 96 horas de incubación, se cosecharon las células y se realizaron dos lavados con medio de cultivo, ajustando a una concentración celular de 1×10^5 células/pozo e incubadas durante 10 días, terminado el tiempo de incubación se realizó un conteo celular mediante azul de tripano.

5.7 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Para la determinación de los efectos del IMMUNEPOTENT CRP sobre el ciclo celular se empleo el kit comercial CycleTest™Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. 1×10^5 células fueron previamente tratadas durante 96 horas con los tratamientos de IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO, posteriormente las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 1 mL de Buffer solution (conteniendo citrato de sodio, sucrosa y dimetil sulfóxido), luego las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a $300 \times g$ a $25^\circ C$ y el sobrenadante fue eliminado, posteriormente el pellet fue resuspendido en 1 mL de Buffer solution, se realizó nuevamente la centrifugación a las mismas condiciones anteriores, el sobrenadante fue decantado, y se agregaron 250 μL /tubo de solución A (conteniendo buffer de tripsina en un detergente con tetracloruro de espermina), incubando durante 10 minutos y enseguida se añadieron 200 μL /tubo de la solución B (Inhibidor de tripsina y ribonucleasa A), e incubando 10 minutos, y finalmente se añadieron sobre estas soluciones 200 μL /tubo de la solución C (yoduro de propidio), las

muestras fueron mantenidas en oscuridad a 4°C. La adquisición de los datos fue realizada mediante el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San José California, USA), 10000 eventos fueron analizados, utilizando el software ModFit LT versión 4.0 (Verity Software, Topsham, USA).

5.8 Evaluación de las características morfológicas mediante la tinción por Romanowsky

Para determinar los efectos de los tratamientos sobre el tamaño y características morfológicas de las células K562, las células tratadas con IMMUNEPOTENT CRP, PMA y DMSO fueron fijadas en portaobjetos con 1% de formaldehído durante 1 minuto a temperatura ambiente (20-25°C), luego se sumergieron los portaobjetos en la solución de eosina incubando durante 3 minutos, finalmente los portaobjetos se transfieren a la solución de azul de metileno, incubando 30 segundos, lavando cada uno con agua desionizada, en repetidas ocasiones, para eliminar el exceso de colorante, esto se llevo a cabo mediante el uso del kit comercial de hemocolorante rápido (Hycel, México), finalmente fueron observados mediante microscopia invertida en objetivos de 40X (TE-ECLIPSE 300, Nikon, Tokyo, Japan) y las imágenes fueron fotografiadas.

5.9 Evaluación de la expresión de los marcadores de superficie CD14⁺, CD68⁺, CD163⁺ y CD42a⁺

Para evaluar si el tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP conduce a la diferenciación hacia el linaje monocito/macrófago, las células fueron cosechadas después de las 96 horas de incubación con los diferentes tratamientos, luego se lavaron con PBS, eliminando el sobrenadante y tras dos lavados por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos con PBS, se agregaron 5 µL de los diferentes anticuerpos (anti-CD14 PE (Invitrogen, México, D.F.), anti-CD68 FITC y anti-CD163 APC (BD Biosciences, San José California, USA)). La población celular CD14⁺ fue gateada para la evaluación de las población CD68⁺ y CD163⁺.

Por otra parte, para evaluar el linaje megacariocítico las células fueron incubadas con anti-CD42a PerCP (BD Biosciences, San José California, USA) en PBS con 1% de SFB y 0.1% de azida de sodio durante 30 minutos a 25°C, después de la incubación las muestras fueron lavadas con PBS y 10,000 eventos fueron analizados mediante el citómetro de flujo marca BD Accuri C6 (BD Biosciences, San José California, USA).

5.10 Evaluación de la actividad fagocítica mediante citometría de flujo

Las células K562 tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO durante 96 horas, fueron lavadas con PBS en tres ocasiones, finalmente fueron incubadas con Isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-dextran, 0.1mg/mL; peso molecular 70 000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO,USA) a 37°C, como control negativo se añadió otro tubo conteniendo células K562 con FITC-dextran incubado a 4°C, temperatura a la cual se inhibe la fagocitosis y uno más en medio sin FITC-Dextran (con H₂O), incubados durante 1 hora, posteriormente para detener la fagocitosis, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X frío suplementado con 1% de suero fetal bovino para eliminar el exceso de FITC-Dextran que se encuentre en el medio o adherido inespecíficamente a la superficie de las células. La actividad fagocítica fue cuantificada mediante el porcentaje de células que lograron captar el FITC-dextran, mediante el análisis de 10,000 eventos a través de un citómetro de flujo marca BD Accuri C6 (BD Biosciences, San José California, USA).

5.11 Determinación de la producción de óxido nítrico mediante ensayo colorimétrico

Los sobrenadantes de la línea K562 tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron utilizados para determinar la producción de ON mediante el empleo del kit comercial (Cayman Chemical Nitrate/nitrite assay kit) el cuál provee un método para la medición total de óxido nítrico (concentración nitrato/nitrito)

mediante dos pasos: primero la conversión de nitrato a nitrito utilizando nitrato reductasa y el segundo paso es la adición del reactivo de Griess, el cuál convierte nitrito en un compuesto púrpura, fueron añadidos 200 μ L de agua destilada como muestra blanco y como muestra problema se colocaron 40 μ L de los sobrenadantes y 40 μ L de buffer assay añadidos en las placas proporcionadas por el kit, posteriormente se agregaron 10 μ L de la enzima cofactor y 10 μ L de nitrato reductasa a cada pozo, esta reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 1 hora, posterior a la incubación se agregaron 50 μ L del reactivo de Griess R1 e inmediatamente después 50 μ L del reactivo de Griess R2 a cada pozo. Finalmente la placa fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los nitritos se determinaron por la generación del cromóforo rosa fluorescente, el cual fue cuantificado a 540 nm empleando un lector de placa Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, modelo EL311 USA).

5.12 Análisis de la producción de citocinas y quimiocinas mediante citometría de flujo

La producción de citocinas fue analizada empleando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (San Diego, USA). Para la evaluación los sobrenadantes celulares obtenidos después de las 96 horas de incubación con los diferentes tratamientos fueron almacenados a -20°C hasta el desarrollo del análisis siguiendo las instrucciones del fabricante. Las citocinas evaluadas fueron IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α y la evaluación de la producción de las quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 y CXCL10-IP-10 fue evaluada mediante el kit Human Chemokine (BD Cytometric Bead Array (CBA) San Diego, USA) siguiendo el protocolo del fabricante, y el análisis fue realizado empleando el software FCAP array v1.0 (Soft Flow Inc., USA).

5.13 Análisis Estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) y Dunnett para discernir si existe diferencia significativa entre tratamientos y controles, mediante el uso del programa computacional SPSS 12.0 con una significancia de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de K562, MOLT-3, monocitos primarios humanos y macrófagos peritoneales murinos

La muerte celular en la línea K562 incrementó significativamente con las diferentes dosis del IMMUNEPOTENT CRP ((0.5 U/mL (33.0%), 0.75 U/mL (93.2%) y en 1 U/mL (96.8%)), comparado con el control (1.5%) (Figura 12), la línea celular MOLT-3 fue más sensible a el tratamiento con el IMMUNEPOTENT CRP causando muerte celular de manera dependiente de dosis ((0.21 U/mL (18.8%), 0.28 U/mL (62.0%), 0.35 U/mL (67.1%), 0.5 U/mL (79.8%), 0.75 U/mL (87.5%) y 1 U/mL (94.7%)) comparado con el control (2.4%) (Figura 13). Por el contrario la viabilidad celular relativa de monocitos primarios humanos y macrófagos peritoneales murinos tratados con el IMMUNEPOTENT CRP permanece en 75 y 80%, respectivamente (Figura 14). El tratamiento con el PMA afecta la viabilidad celular en la línea K562 incrementando el porcentaje de células positivas a yoduro de propidio (29.1%) (Figura 12) sin embargo; en la línea celular MOLT-3 no fue afectada (5.2%) (Figura 13). El DMSO no afectó significativamente la viabilidad en las líneas K562 (1.6%) y MOLT-3 (1.6%) con respecto al control (Figura 12 y 13). Por otra parte, se observó que el IMMUNEPOTENT CRP a bajas dosis inducen diferenciación celular similar a los resultados obtenidos con el tratamiento con PMA (Figura 18 y 19), por lo que dosis de IMMUNEPOTENT CRP en un rango de 0.07 U/mL a 0.35 U/mL fueron empleados en los siguientes experimentos para evaluar la actividad de diferenciación celular (Figura 12).

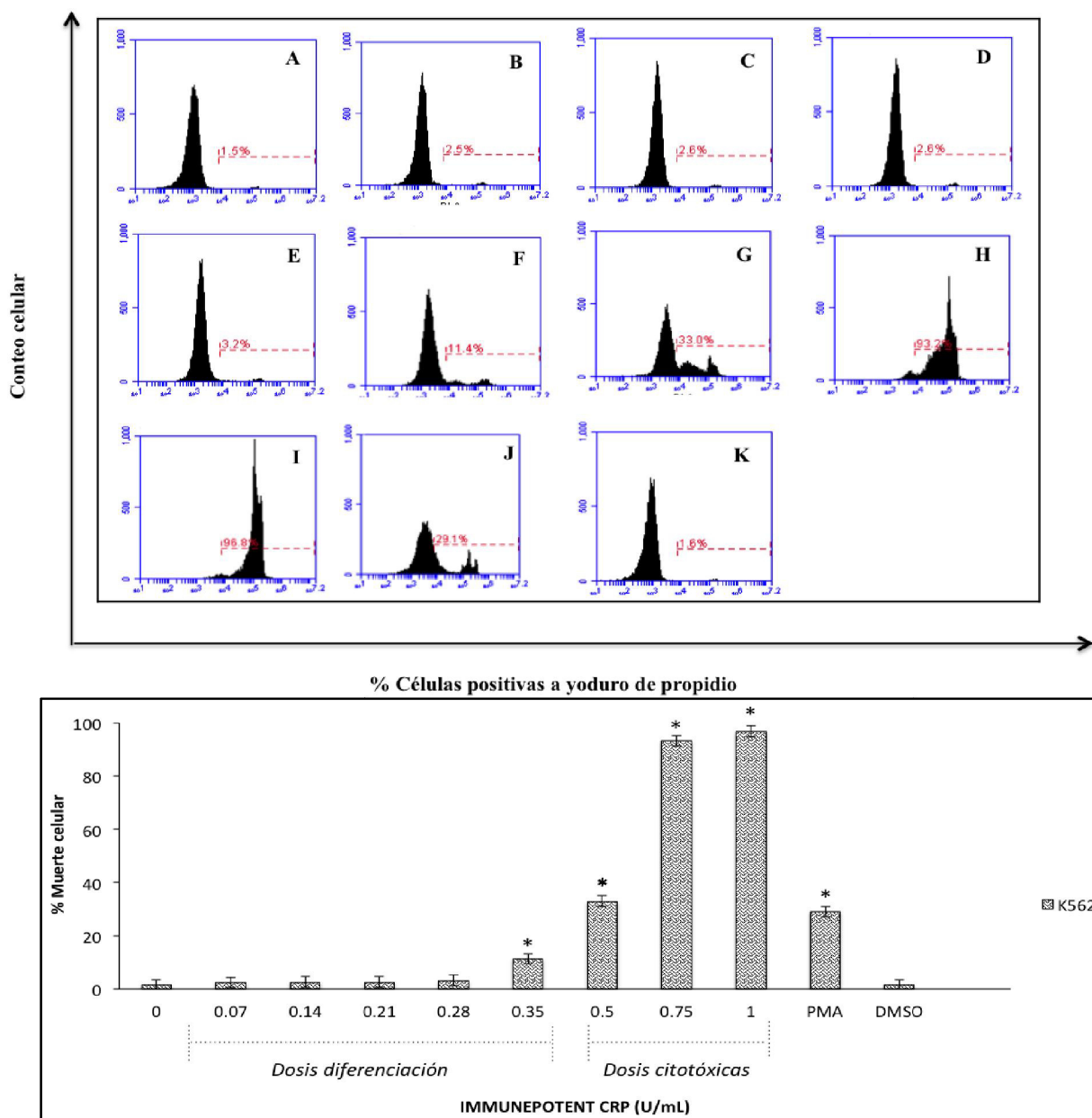


Figura 12. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos, los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas. Finalmente se realizó la prueba de yoduro de propidio para la determinación del porcentaje de muerte celular mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos de tres experimentos independientes. **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** 0.5 U/mL, **H)** 0.75 U/mL, **I)** 1 U/mL, **J)** PMA 10ng/mL, **K)** DMSO 1.5% v:v. La gráfica demuestra el promedio de tres experimentos independientes (*p<0.05).

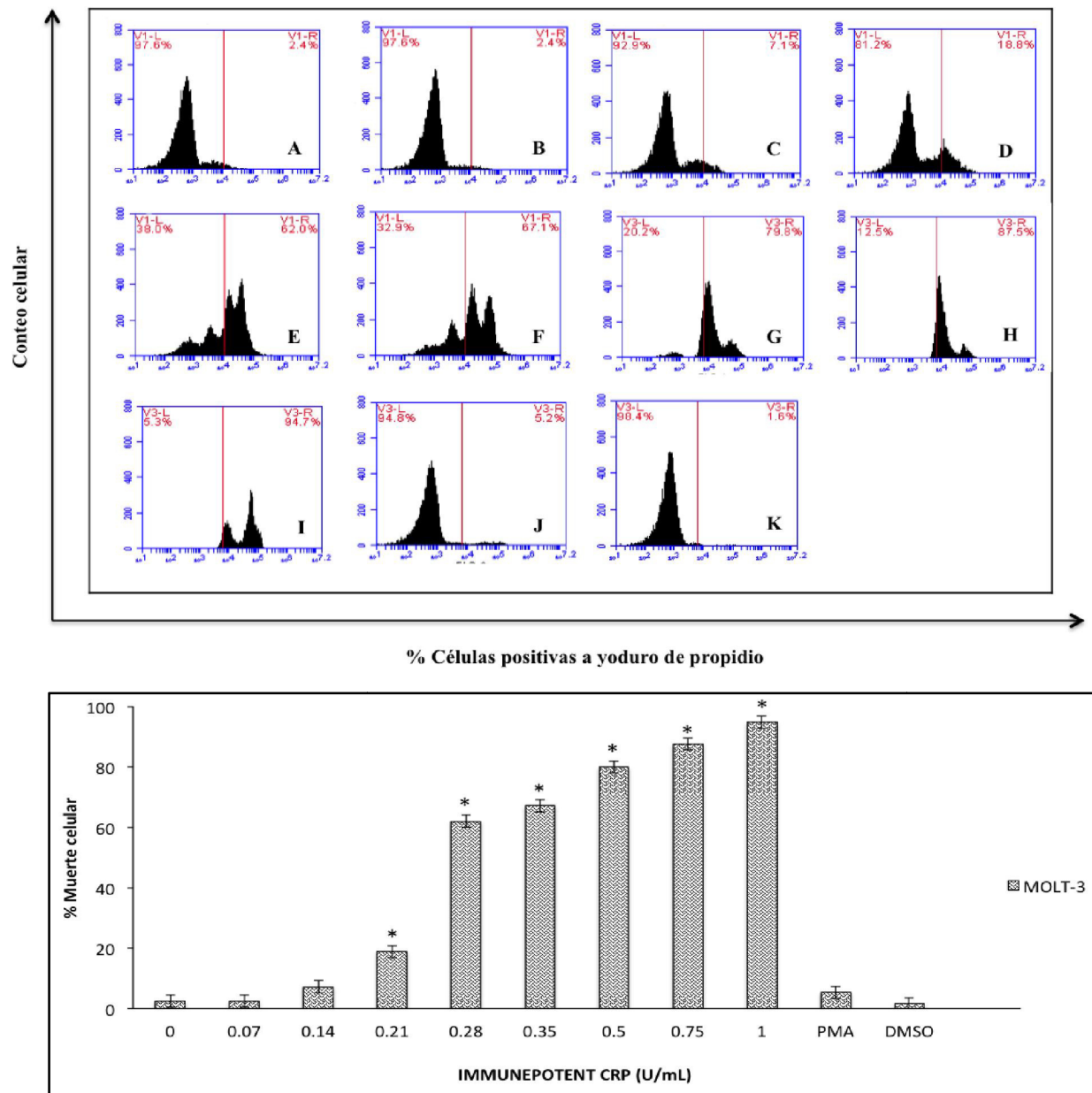


Figura 13. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea MOLT-3. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos, los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas. Finalmente se realizó la prueba de yoduro de propidio para la determinación del porcentaje de muerte celular mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos de tres experimentos independientes. **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** 0.5 U/mL, **H)** 0.75 U/mL, **I)** 1 U/mL, **J)** PMA 10ng/mL, **K)** DMSO 1.5% v.v. La gráfica demuestra el promedio de tres experimentos independientes (*p<0.05).

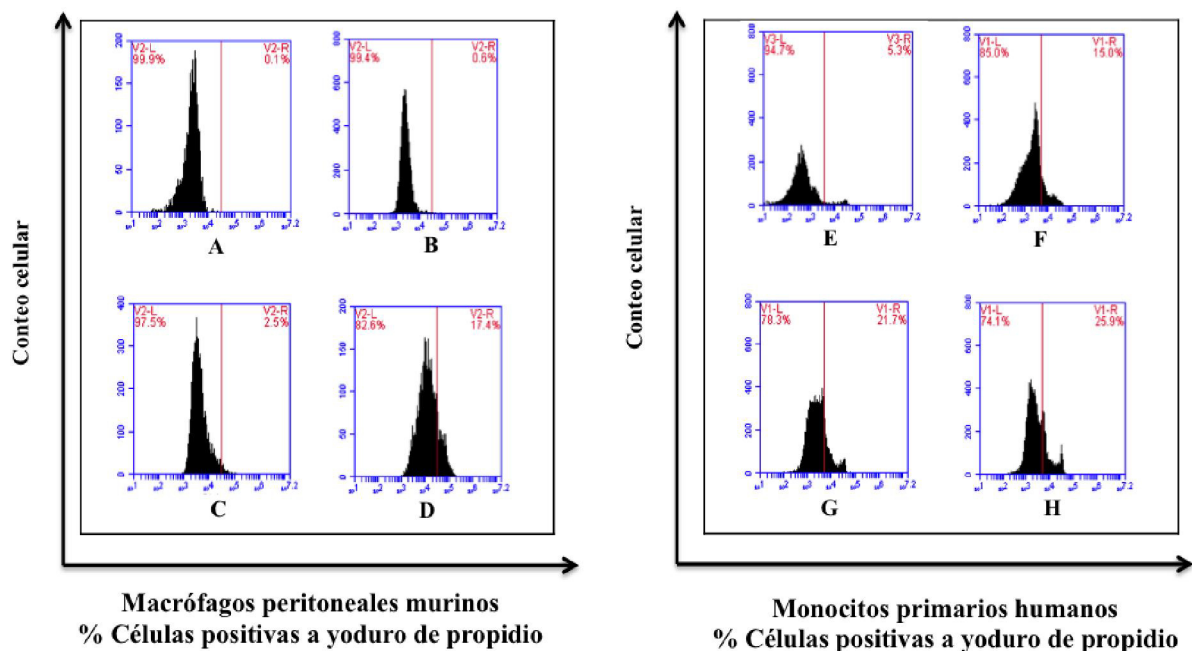


Figura 14. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos y monocitos primarios humanos. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos, los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO_2 durante 96 horas. Finalmente se realizó la prueba de yoduro de propidio para la determinación del porcentaje de muerte celular mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos de tres experimentos independientes. Los incisos A – D muestran los resultados obtenidos a partir de macrófagos peritoneales murinos: **A)** Control **B)** 0.5 U/mL, **C)** 0.75 U/mL, **D)** 1 U/mL, los incisos E – H muestran los resultados obtenidos a partir de monocitos primarios humanos: **E)** Control, **F)** 0.5 U/mL, **G)** 0.75 U/mL, **H)** 1 U/mL.

6.2 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre el ciclo y proliferación celular en la línea K562

Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 – 0.35 U/mL) inducen alteraciones en la progresión del ciclo celular, un ligero incremento en la fase S fue observado en las siguientes dosis evaluadas: 0.14 U/mL (59.62%), 0.21 U/mL (64.45%), 0.28 U/mL (58.68%), 0.35 U/mL (58.64%), por el contrario; PMA y DMSO disminuyeron los porcentajes de células en fase S (16.09% y 45.77%), respectivamente, en comparación con el control (52.34%). Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP afectaron ligeramente los porcentajes de células en fase G₂/M (0.14 U/mL (9.57%), 0.21 U/mL (8.19%), 0.28 U/mL (9.46%), 0.35 U/mL (8.27%)), en comparación con el control (3.24%) y el DMSO (4.81%), contrario a lo obtenido con el PMA (33.07%). Además, una disminución en la fase G₀/G₁ fue observada con los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 U/mL (37.61%), 0.14 U/mL (30.80%), 0.21 U/mL (27.36%), 0.28 U/mL (31.86%), 0.35 U/mL (33.09%)) contrario a el PMA (50.84%) y DMSO (49.42%) comparado con el control (44.43%) (Figura 15). Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP durante 96 horas de incubación disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) la tasa de proliferación celular de manera dependiente de dosis (0.07 U/mL (1,550,000 céls/mL), 0.14 U/mL (1,125,000 céls/mL), 0.21 U/mL (775,000 céls/mL), 0.28 U/mL (550,000 céls/mL), 0.35 U/mL (400,000 céls/mL)), resultados similares fueron obtenidos con los tratamientos con el PMA y DMSO (75,000 céls/mL y 1,000,000 céls/mL), respectivamente, en comparación con el control (1,650,000 céls/mL) (Figura 16).

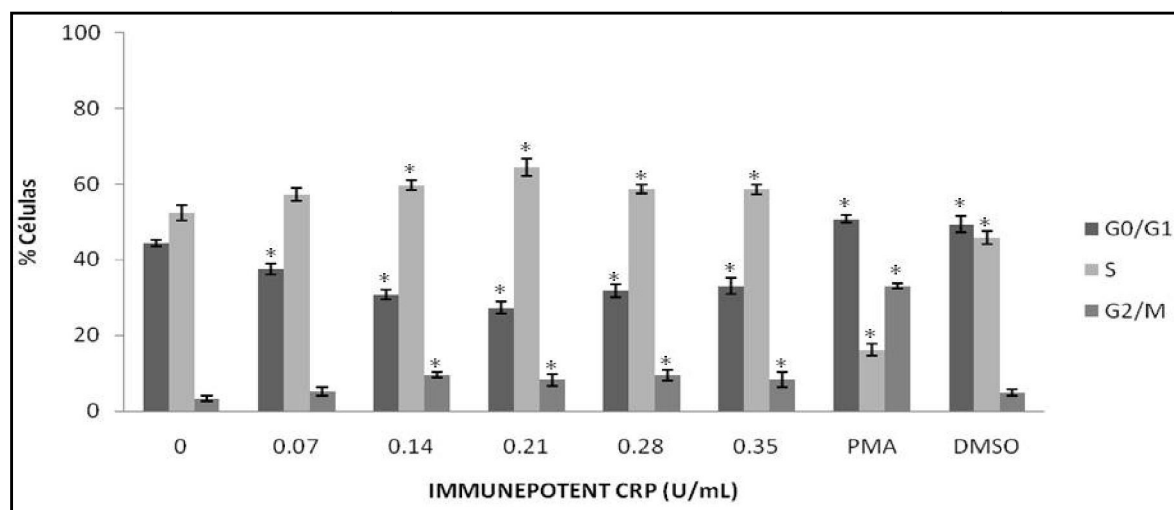
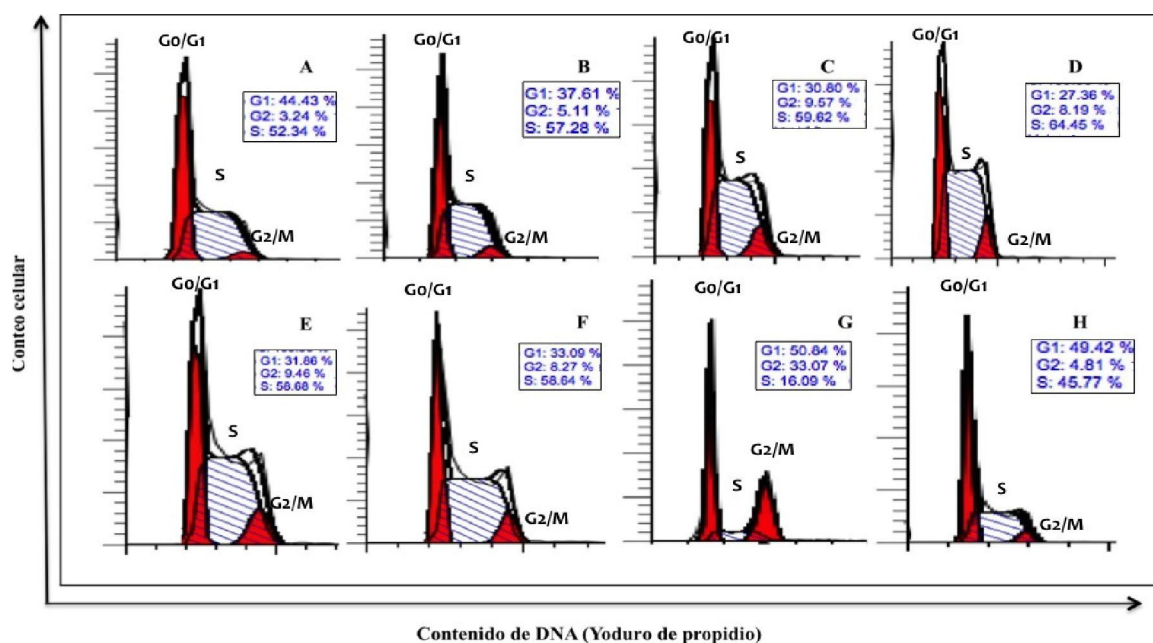


Figura 15. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre el ciclo celular en la línea K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA y DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas. La evaluación del ciclo celular fue realizado mediante el empleo del kit Cycle Cell Test™ Plus DNA Reagent Kit (Becton Biosciences, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los histogramas demuestran los resultados representativos: **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10 µg/mL, **H)** DMSO 1.5% v:v, el análisis fue realizado mediante el software Modfit LT versión 4.0 (Verity Software, Topsham, USA). La gráfica demuestra el promedio de experimentos independientes (*p<0.05).

Por otro lado, las células K562 previamente tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 – 0.35 U/mL), PMA o DMSO, se lavaron en dos ocasiones con RPMI 1640, para eliminar remanentes de los tratamientos, luego fueron cosechadas y ajustadas a una concentración celular de 1×10^5 células/ pozo e incubadas durante 10 días, como se mencionó anteriormente en la sección de materiales y métodos, encontrando que los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP disminuyen significativamente ($p < 0.05$) el rango de proliferación de manera dependiente de dosis (0.07 U/mL (2,450,000 céls/mL), 0.14 U/mL (1,250,000 céls/mL), 0.21 U/mL (1,170,000 céls/mL), 0.28 U/mL (1,050,000 céls/mL), 0.35 U/mL (550,000 céls/mL) en comparación con el control (3.150,000 céls/mL), resultados similares fueron determinados por el PMA (60,000 céls/mL) y DMSO (2,600,000 céls/mL) (Figura 17).

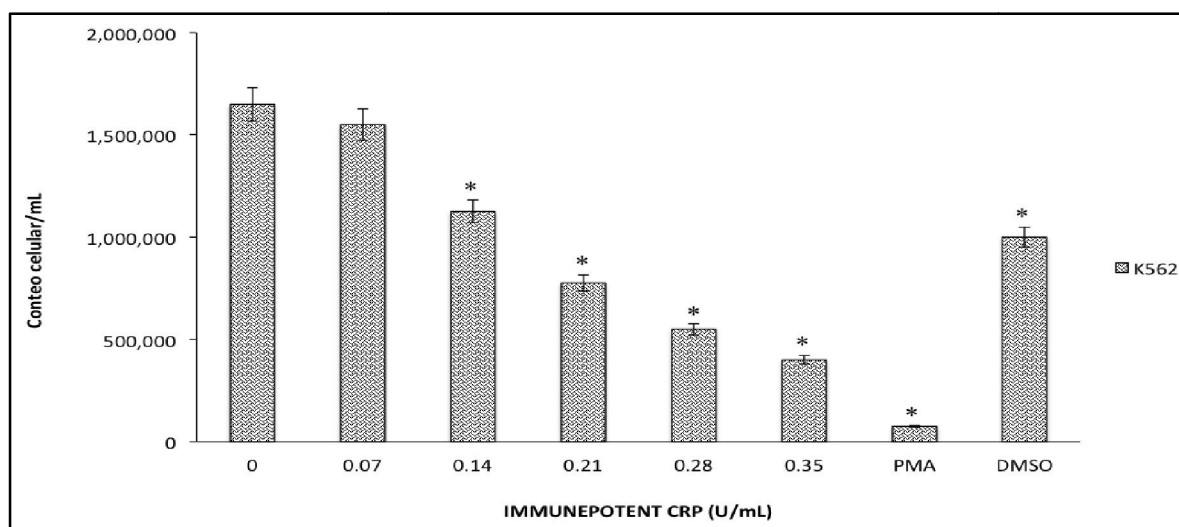


Figura 16. IMMUNEPOTENT CRP disminuye la proliferación celular de la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas. Posteriormente, las células fueron colectadas y resuspendidas en PBS y finalmente el porcentaje de proliferación celular fue estimado por conteo celular de cada grupo mediante la tinción de exclusión por azul de tripano.

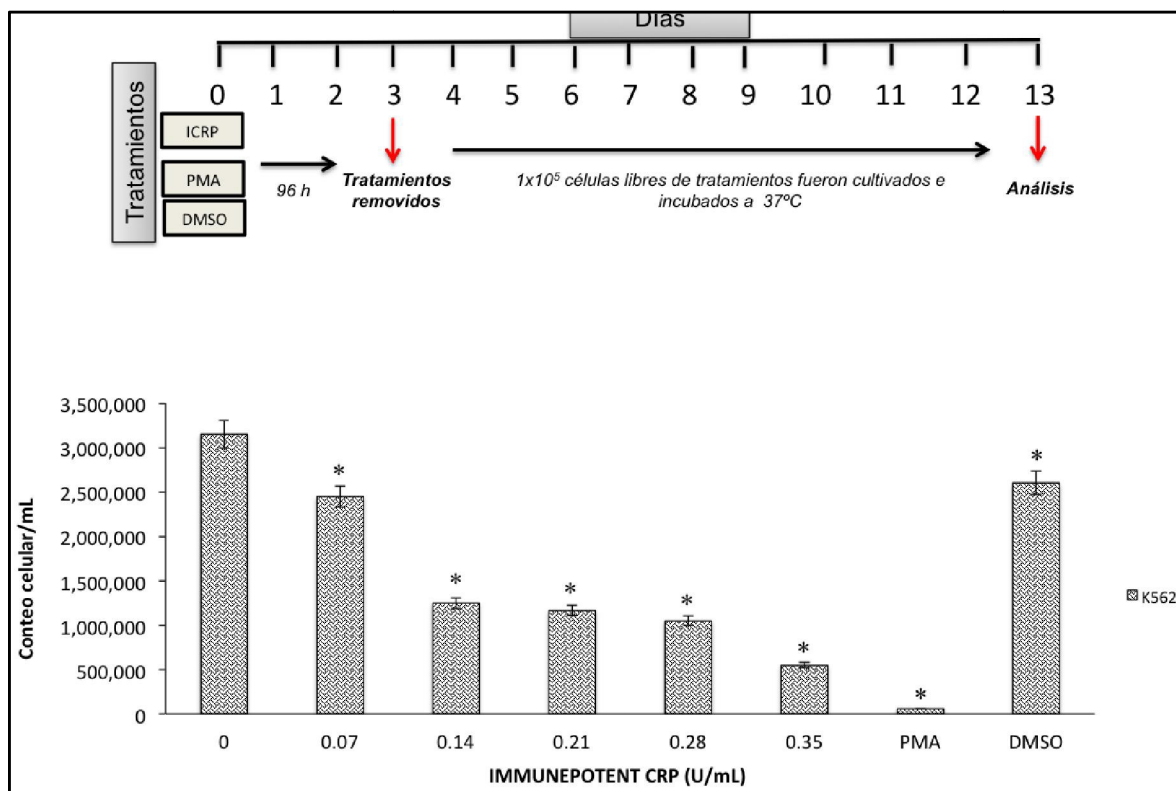


Figura 17. IMMUNEPOTENT CRP disminuye la proliferación después de inducir la diferenciación celular en la línea K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, después de la incubación, las células fueron colectadas, centrifugadas, lavadas con medio de cultivo y ajustadas a 1×10^5 céls/pozo e incubadas durante 10 días y finalmente la proliferación celular fue evaluada mediante azul de tripano. El esquema de tiempo de los tratamientos presentado en la parte superior.

6.3 IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación celular hacia linajes monocítico/macrófago y megacariocítico en la línea celular K562

Los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP (0.07 – 0.35 U/mL) durante 96 horas, indujeron cambios morfológicos característicos de una diferenciación monocítica/macrófago de manera dependiente de dosis evaluado mediante la tinción de Romanowsky, las células desarrollaron pseudópodos, incrementaron su tamaño celular así como la adherencia a las placas de cultivo, estos cambios fueron similares a los efectos obtenidos con el PMA, comparado con las células control las cuales permanecieron con la habitual morfología blastoide de la línea celular (Figura 18).

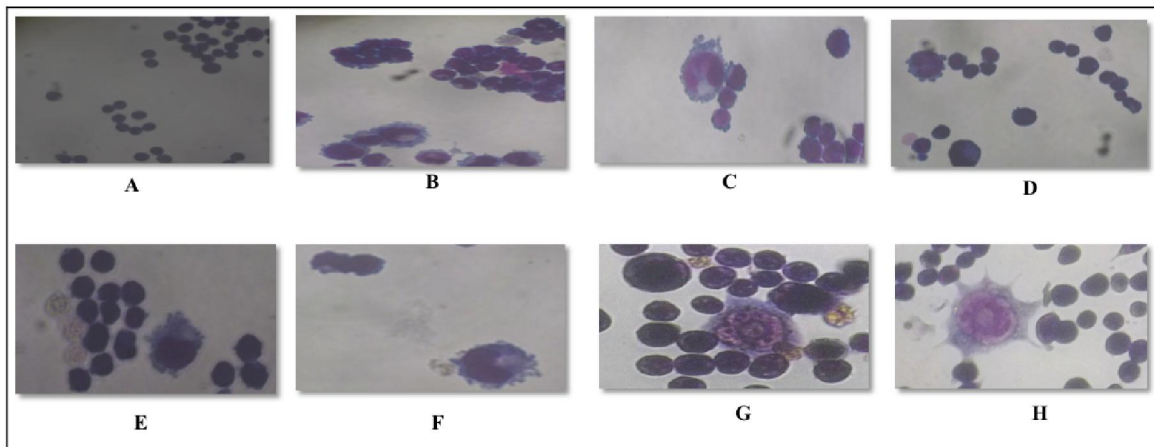


Figura 18. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación monocítica/macrófago en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, finalizando la incubación, las células fueron colectadas y fijadas con 1% de paraformaldehído en portaobjetos, luego estos fueron teñidos con la tinción Romanowsky y los cambios morfológicos fueron visualizados mediante microscopia (magnificación 40x) y las imágenes fueron fotografiadas. **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10ng/mL, **H)** DMSO 1.5% v/v.

Para confirmar la diferenciación monocítica/macrófago inducida por el IMMUNEPOTENT CRP y controles positivos, se evaluó el marcador de superficie CD14⁺, determinando un incremento en la expresión dependiente de dosis (0.07 U/mL (14.9%), 0.14 U/mL (24.4%), 0.21 U/mL (31.0%), 0.28 U/mL (35.2%), y 0.35 U/mL (39.7%)) resultados similares se obtuvieron con el PMA (29.6%) comparado con el control que mostró una expresión del 6.1% y el DMSO (3.3%) (Figura 19).

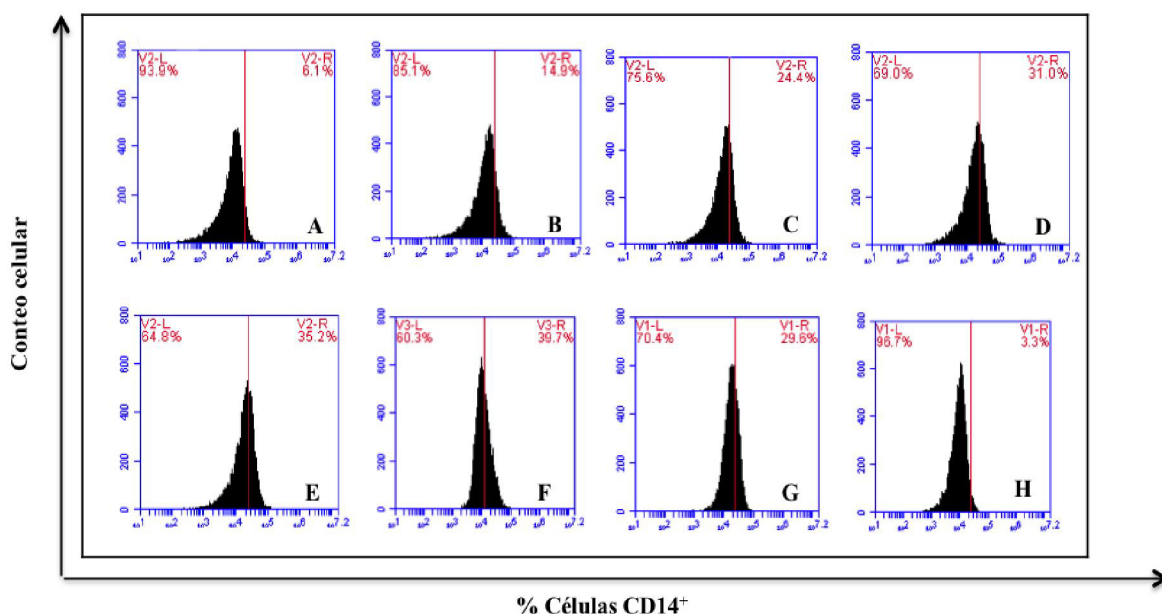


Figura 19. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación monocítica/macrófago en la línea celular K562 evaluado por la expresión del marcador de superficie CD14⁺. 1x10⁵ células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA y DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, luego las células fueron colectadas, lavadas con PBS e incubadas con anti-CD14 PE Texas red en PBS suplementado con 1% de SFB y 0.1% de azida de sodio durante 30 minutos, finalmente 10000 eventos fueron analizados mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados obtenidos: **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10mg/mL, **H)** DMSO 1.5% v:v.

La población celular CD14⁺ fue seleccionada para establecer la población correspondiente a monocitos/macrófagos, en esta región se analizaron los marcadores CD68⁺ y CD163⁺ para determinar el porcentaje de macrófagos polarizados hacia el fenotipo M1 y M2, respectivamente. Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP incrementaron significativamente de manera dependiente de dosis la expresión del marcador CD163⁺ indicativo de una polarización hacia macrófagos M2 (0.07 U/mL (33.0%), 0.14 U/mL (47.6%), 0.21 U/mL (50.5%), 0.28 U/mL (51.7%), 0.35 U/mL (49.5%), el tratamiento con el PMA incrementó el marcador CD163⁺ (26.6%), sin embargo este porcentaje fue menor comparado con el IMMUNEPOTENT CRP, el DMSO no mostró diferencia en comparación con el control (8.7% y 12.0%, respectivamente). No se observó diferencia significativa en los porcentajes de expresión del marcador CD68⁺ en los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 U/mL (1.8%), 0.14 U/mL (1.7%), 0.21 U/mL (1.1%), 0.28 U/mL (1.5%) y 0.35 U/mL (2.7%)), el tratamiento con el PMA incrementó ligeramente la expresión del marcador (5.6%) contrario a lo obtenido con el DMSO (0.4%) siendo similar con el control (0.4%). La población celular doble positiva para CD68⁺/CD163⁺ incrementa ligeramente la expresión con los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 U/mL (4.2%), 0.14 U/mL (7.1%), 0.21 U/mL (4.8%), 0.28 U/mL (4.1%), 0.35 U/mL (5.3%)), por el contrario el PMA incrementó significativamente (27.5%), el DMSO no afectó el porcentaje de los marcadores comparado con el control (0.1% y 0.3%), respectivamente (Figura 20).

Una de las características fundamentales de los macrófagos es el incremento en su capacidad fagocítica en comparación a sus progenitores celulares, encontrando que los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP incrementan significativamente de manera dosis dependiente la capacidad de fagocitar el reactivo FITC-dextran: (0.07 U/mL (13.7%), 0.14 U/mL (17.7%), 0.21 (21.3%), 0.28 U/mL (31.4%), 0.35 U/mL (38.3%)), resultados similares fueron obtenidos con el PMA (32.7%) comparado con el control (5.3%), el tratamiento con el DMSO no afectó significativamente la actividad fagocítica (7.9%) (Figura 21). Finalmente, la diferenciación megacariocítica fue evaluada mediante la expresión del marcador

CD42a⁺, encontrando que el PMA posee potencial de diferenciación, incrementando la expresión en un 24.8% y el IMMUNEPOTENT CRP induce un ligero incremento de manera dependiente de dosis en los niveles de expresión (0.07 U/mL (4.8%), 0.14 U/mL (7.6%), 0.21 U/mL (8.9%), 0.28 U/mL (13.1%) y 0.35 U/mL (13.9%)). El tratamiento con DMSO no afectó los porcentajes del marcador (0.2%) en comparación con el control (0.9%) (Figura 22). Los resultados anteriormente descritos demuestran que el IMMUNEPOTENT CRP posee el potencial para inducir diferenciación monocítica/macrófago hacia un fenotipo M2 y una débil capacidad para inducir diferenciación megacariocítica.

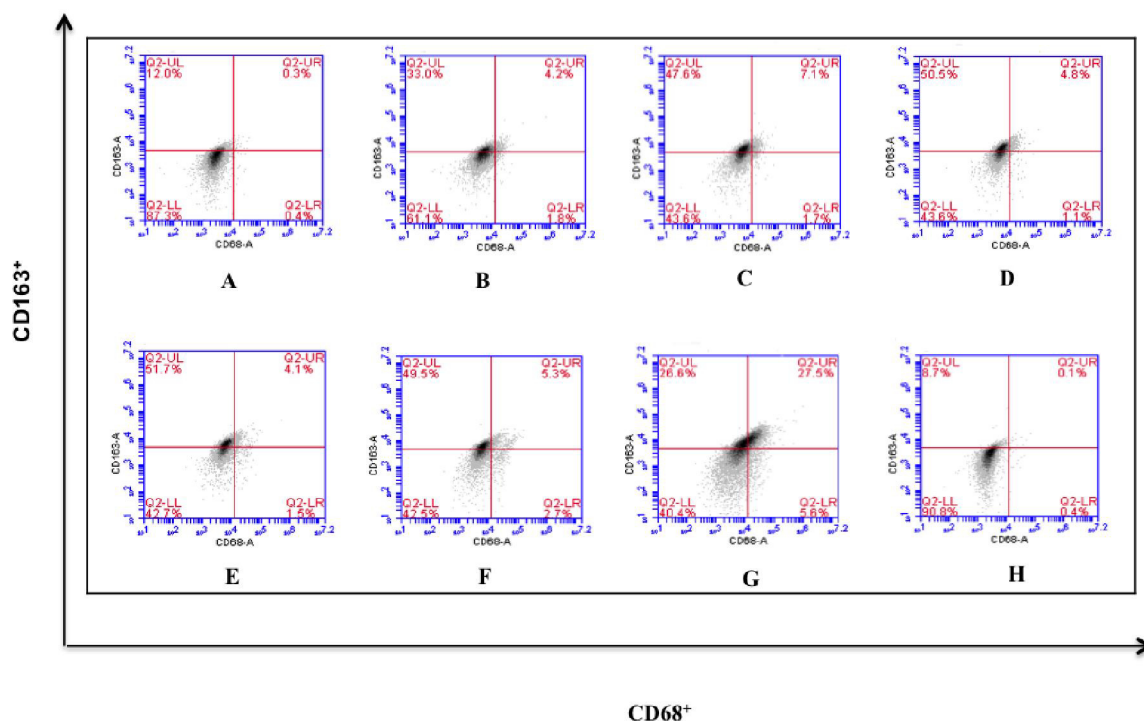


Figura 20. IMMUNEPOTENT CRP induce polarización hacia macrófagos M2 evaluado mediante la expresión del marcador CD163⁺ en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, luego las células fueron colectadas, lavadas con PBS e incubadas con anti-CD14 PE Texas red, anti-CD68 FITC y anti-CD163 APC en PBS suplementado con 1% de SFB y 0.1% de azida de sodio durante 30 minutos, finalmente 10,000 eventos fueron analizados mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos: **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10mg/mL, **H)** DMSO 1.5% v:v.

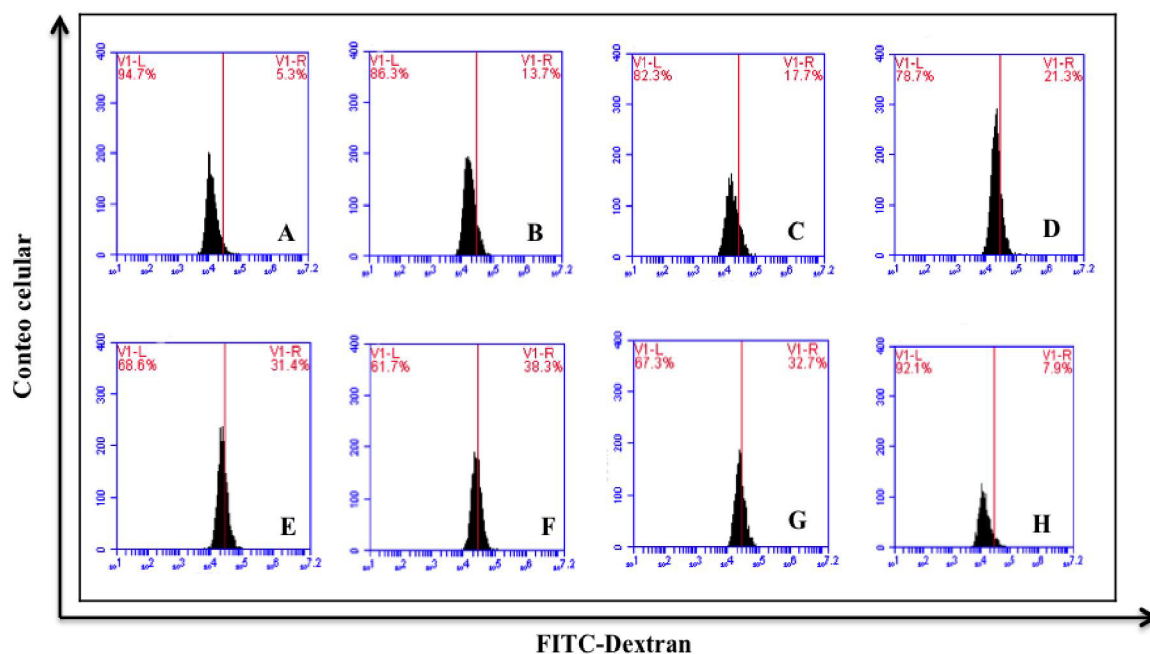


Figura 21. IMMUNEPOTENT CRP incrementa la actividad fagocítica en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, luego las células fueron colectadas, lavadas con PBS y el FITC-Dextran fue agregado e incubado durante 1 h a 37°C como se describió previamente en material y métodos, los histogramas muestran los resultados representativos de tres experimentos independientes. Los histogramas demuestran los resultados representativos: **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10mg/mL, **H)** DMSO 1.5% v:v

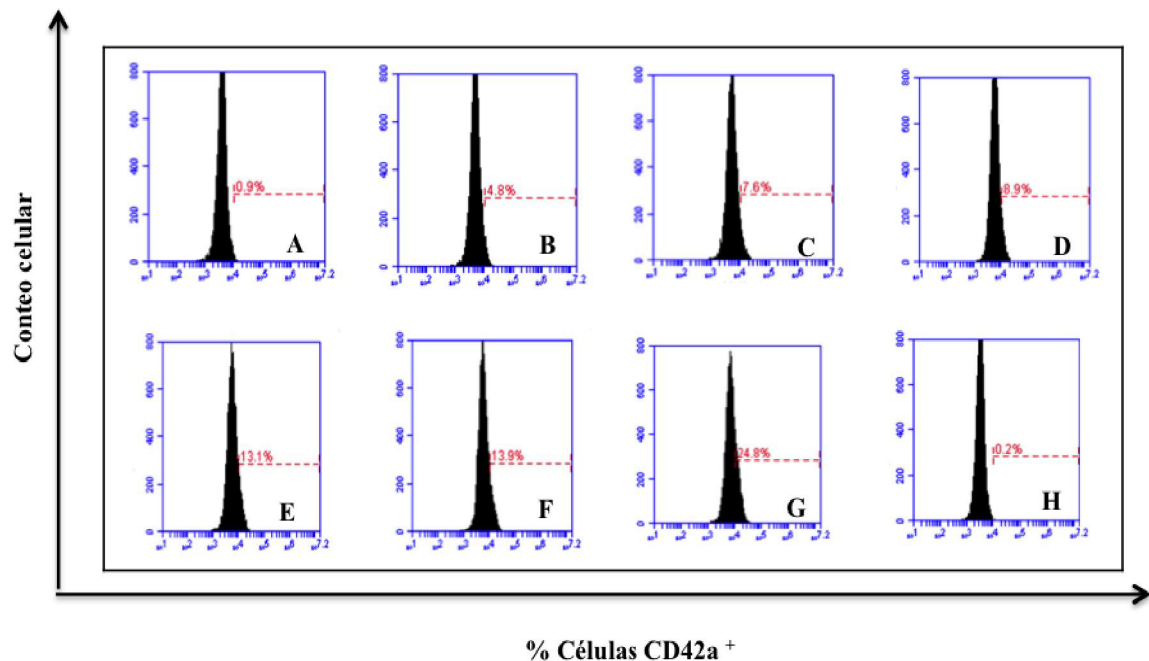


Figura 22. IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación megacariocítica en la línea celular K562 evaluado por la expresión del marcador de superficie CD42a⁺. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos, las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, luego las células fueron colectadas, lavadas con PBS e incubadas con anti-CD42a PerCP en PBS suplementado con 1% de SFB y 0.1% de azida de sodio durante 30 minutos, finalmente 10,000 eventos fueron analizados mediante citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos: **A)** Control, **B)** 0.07 U/mL, **C)** 0.14 U/mL, **D)** 0.21 U/mL, **E)** 0.28 U/mL, **F)** 0.35 U/mL, **G)** PMA 10mg/mL, **H)** DMSO 1.5% v:v.

6.4 Determinación de la resistencia celular en la línea K562

Para determinar si las células diferenciadas permanecían sensibles a el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP, una vez finalizadas las 96 horas de incubación con el IMMUNEPOTENT CRP a dosis de 0.35 U/mL, las células fueron cosechadas y ajustadas a 1×10^5 céls/mL, añadiendo el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP a dosis de 1 U/mL, causando un porcentaje de muerte celular del 84.4% (Figura 23), comparado a los resultados anteriormente mencionados donde el IMMUNEPOTENT CRP a 1 U/mL en las células K562 incrementa el porcentaje de muerte celular en un 96.8% (Figura 12), por el contrario en macrófagos peritoneales murinos y monocitos primarios humanos indujo el 17.4% y 27.9% de muerte celular, permaneciendo alrededor de un 70% de células viables (Figura 14).

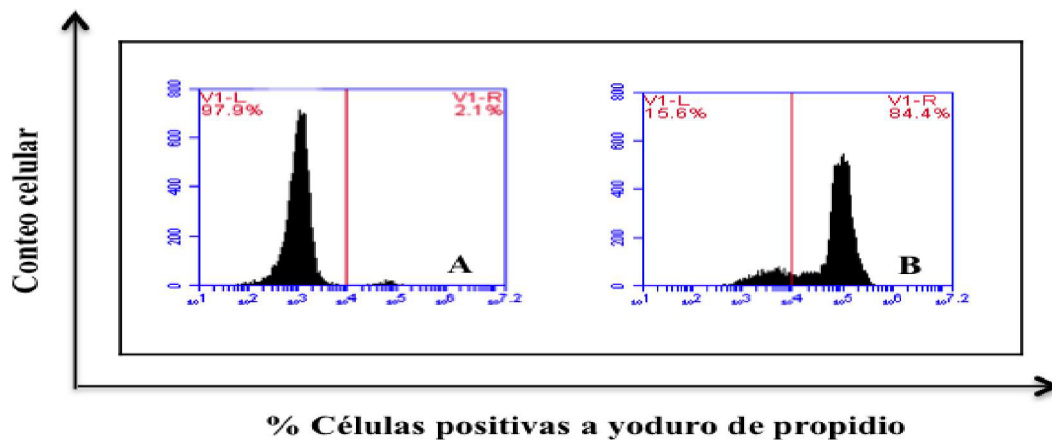


Figura 23. Efecto de la dosis citotóxica del IMMUNEPOTENT CRP (1U/mL) sobre la línea celular K562 tratada previamente a dosis de diferenciación del IMMUNEPOTENT CRP (0.35 U/mL). 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y el tratamiento con ICRP (0.35 U/mL) incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, después de la incubación, las células fueron colectadas, centrifugadas, lavadas con medio de cultivo y ajustadas a 1×10^5 céls/pozo, luego 1U/mL de ICRP fue añadido e incubado nuevamente durante 96 horas. Finalmente, la muerte celular fue detectada por la tinción con yoduro de propidio y el porcentaje de intercalación sobre el DNA fue determinado por citometría de flujo. Los histogramas demuestran los resultados representativos: **A)** Control, **B)** ICRP 1 U/mL.

6.5 IMMUNEPOTENT CRP disminuye la producción de óxido nítrico y altera la producción de los niveles de citocinas y quimiocinas en la línea celular K562

Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP significativamente disminuyen la producción de óxido nítrico de manera dependiente de dosis en las células K562 después de 96 horas de incubación (0.07 U/mL (57.12 mM), 0.14 U/mL (50.72 mM), 0.21 U/mL (44.32 mM), 0.28 U/mL (30.72 mM), 0.35 U/mL (13.12 mM)) comparado con el control (60.64 mM) y el tratamiento con el PMA (51.68 mM). El tratamiento con el DMSO disminuyó significativamente la producción de óxido nítrico (17.28 mM) similar a los efectos obtenidos a 0.35 U/mL de IMMUNEPOTENT CRP (Figura 24).

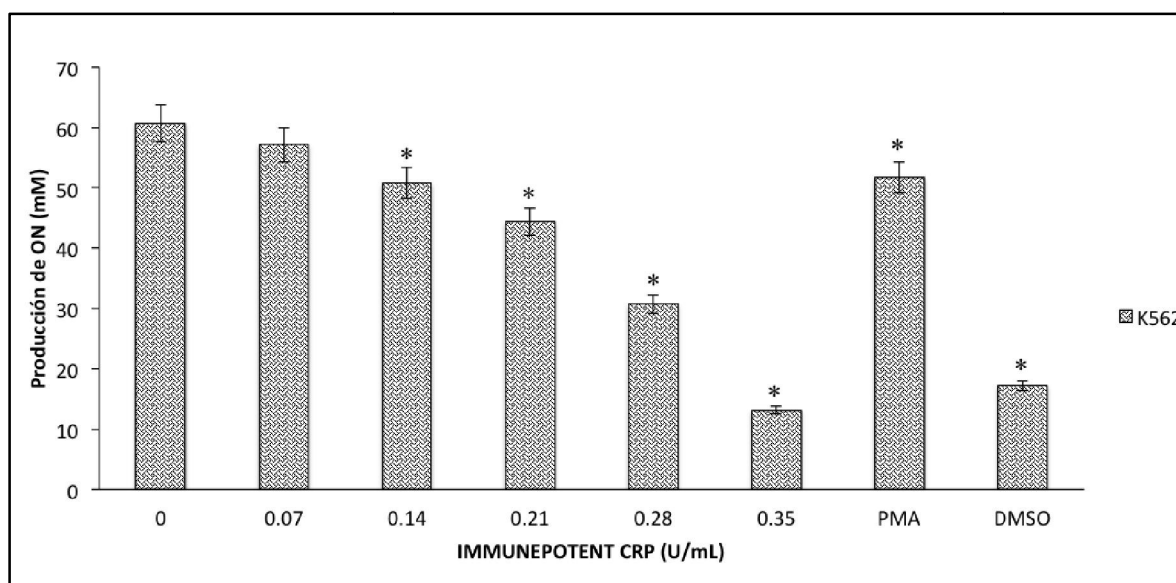


Figura 24. IMMUNEPOTENT CRP disminuye la producción del óxido nítrico (ON) en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos y las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, finalmente los sobrenadantes celulares fueron colectados y procesados siguiendo las instrucciones del fabricante (Nitrate-nitrite colorimetric assay kit, Cayman Chemical, USA). Los resultados son promedios de tres experimentos independientes (*p<0.05).

Además, las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) y la producción de quimiocinas (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES y CXCL8/IL-8) fueron evaluadas en la línea celular K562 tratadas con IMMUNEPOTENT CRP, PMA y DMSO durante 96 horas. Las células control producen IL-6, IL-8 y TNF- α pero no IL-1 β (Tabla 3). Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 – 0.28 U/mL) incrementaron la producción de IL-6 (0.07 U/mL (307.83 pg/mL), 0.14 U/mL (342.26 pg/mL), 0.21 U/mL (293.94 pg/mL), 0.28 U/mL (213.17 pg/mL), por el contrario a 0.35 U/mL disminuyó ligeramente la producción de esta citocina (115.18 pg/mL), el DMSO disminuyó significativamente la producción (4.29 pg/mL) comparado con el control (126.03 pg/mL). La producción de la IL-8 incremento en los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP (0.07 U/mL (56.22 pg/mL), 0.14 U/mL (54.4 pg/mL), 0.21 U/mL (23.22 pg/mL), 0.28 U/mL (27.06 pg/mL), 0.35 U/mL (34.95 pg/mL), comparado con el control (18.84 pg/mL) y el DMSO (2.96 pg/mL). El IMMUNEPOTENT CRP incremento la producción de TNF- α a dosis de 0.07 U/mL (1,384.69 pg/mL), 0.14 U/mL (1,882.90 pg/mL) y 0.21 U/mL (950.22 pg/mL), sin embargo a dosis de 0.28 U/mL y 0.35 U/mL disminuyó la producción (431.83 pg/mL y 310.54 pg/mL, respectivamente), el DMSO disminuyó significativamente la producción de TNF- α (37.96 pg/mL) comparado con el control (830.47 pg/mL). Los tratamientos con el PMA incrementan la producción de las citocinas evaluadas IL-1 β (7.17 pg/mL), IL-6 (991.06 pg/mL), IL-8 (17,915.32 pg/mL) y TNF- α (2,347.26 pg/mL) (Tabla 3).

Tratamientos	Producción de citocinas (pg/mL)			
	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α
Control	0.0	126.03	18.84	830.47
ICRP 0.07 U/mL	0.0	307.83	56.22	1,384.69
ICRP 0.14 U/mL	0.0	342.26	54.4	1,882.90
ICRP 0.21 U/mL	0.0	293.94	23.22	950.22
ICRP 0.28 U/mL	0.0	213.17	27.06	431.83
ICRP 0.35 U/mL	0.0	115.18	34.95	310.54
PMA	7.17	991.06	17,915.32	2,347.26
DMSO	0	4.29	2.96	37.96

Tabla 3. IMMUNEPOTENT CRP afecta la producción de IL-6, IL-8 y TNF- α en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos y las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, finalmente los sobrenadantes celulares fueron colectados y procesados siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (San Diego, USA)).

En la línea celular se detectaron niveles de producción de todas las quimiocinas evaluadas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES y CXCL8/IL-8 (25.07 pg/mL, 0.7 pg/mL y 17.84 pg/mL), respectivamente (Tabla 4). Los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP incrementaron la producción de la quimiocina CCL2/MCP-1 (0.07 U/mL (70.42 pg/mL), 0.14 U/mL (66.07 pg/mL), 0.21 U/mL (74.02 pg/mL), 0.28 U/mL (115.81 pg/mL) y 0.35 U/mL (164.15 pg/mL), por el contrario el DMSO disminuyó la producción (10.22 pg/mL) en comparación con el control. Los niveles de producción de la quimiocina CXCL8/IL-8 incrementaron con el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP a dosis de 0.07 U/mL y 0.14 U/mL (47.35 pg/mL y 46.29 pg/mL, respectivamente), a dosis de 0.21 – 0.35 U/mL permanecen valores similares al control (0.21 U/mL (19.44 pg/mL), 0.28 U/mL (20.05 pg/mL) y 0.35 U/mL (28.23 pg/mL)), el DMSO disminuye los niveles de producción (2.58 pg/mL). La producción de CCL5/RANTES no fue afectada significativamente con los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP y DMSO (0.07 U/mL (4.17 pg/mL), 0.14 U/mL (2.76 pg/mL), 0.21 U/mL (0.7 pg/mL), 0.28 U/mL (0.0 pg/mL), 0.35 U/mL (0.31 pg/mL), DMSO (0.0 pg/mL). Los tratamientos con el PMA incrementan la producción de las quimiocinas evaluadas CCL2/MCP-1 (9,994.53 pg/mL) CCL5/RANTES (143.78 pg/mL) y CXCL8/IL-8 (12,105.23 pg/mL) (Tabla 4).

Tratamiento	Producción de quimiocinas (pg/mL)		
	CCL2/MCP-1	CCL5/RANTES	CXCL8/IL-8
Control	25.07	0.7	17.84
ICRP 0.07 U/mL	70.42	4.17	47.35
ICRP 0.14 U/mL	66.07	2.76	46.29
ICRP 0.21 U/mL	74.02	0.7	19.44
ICRP 0.28 U/mL	115.81	0	20.05
ICRP 0.35 U/mL	164.15	0.31	28.23
PMA	9,994.53	143.78	12,105.23
DMSO	10.22	0	2.58

Tabla 4. IMMUNEPOTENT CRP afecta la producción de las quimiocinas en la línea celular K562. 1×10^5 células/pozo fueron cultivadas y los tratamientos con el IMMUNEPOTENT CRP, PMA o DMSO fueron añadidos y las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 96 horas, finalmente los sobrenadantes celulares fueron colectados y procesados siguiendo las instrucciones del fabricante (Human Chemokine (BD Cytometric Bead Array (CBA) San Diego, USA).

7. DISCUSIÓN

La terapia de diferenciación, es una nueva estrategia terapéutica la cual consiste en forzar a las células leucémicas a someterse a la diferenciación celular terminal inhibiendo la proliferación celular teniendo la ventaja de disminuir los efectos adversos de los quimioterapéuticos, ganando gran interés en el tratamiento contra la leucemia (Spira y Carducci, 2003). El descubrimiento de nuevos compuestos con capacidad de inducir diferenciación celular en la leucemia mielógena crónica es requerida debido a que pesar de que el tratamiento con ATRA induce remisión de la enfermedad, no todos los tipos de leucemias son sensibles a este tratamiento y además la administración a largo plazo conduce al desarrollo de hipercalcemia (Aoki et al., 2004). Estudios realizados previamente demuestran que el IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular en un panel de líneas celulares de cáncer de diferente origen como cáncer de mama (MCF-7, BT-474, MDA-MB-453), cáncer de pulmón (A-427, Calu-1), linfoma histiocítico (U-937), melanoma (B16F10) y linfoma murino (L5178Y) (Franco-Molina et al., 2006); en esta investigación se determinó que el IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular en las líneas de leucemia K562 y MOLT-3, sin afectar la viabilidad celular de los monocitos humanos y macrófagos peritoneales murinos, además a bajas dosis el IMMUNEPOTENT CRP demostró actividad de diferenciación sobre la línea celular K562. Estudios similares fueron encontrados cuando las células K562 tratadas con los extractos de *Chemlali olive* (Samet et al., 2014), Huangqi (Hex) (Cheng et al., 2004) y *Achillea fragrantissima* inducen cambios morfológicos similares a los inducidos por los tratamientos con TPA y PMA, indicativos de diferenciación celular a bajas concentraciones del extracto sin afectar la viabilidad celular, sin embargo a altas concentraciones induce muerte celular por apoptosis (Alenad et al., 2013).

El arresto de la progresión del ciclo celular es un pre-requisito para la diferenciación celular, aunque el arresto en la fase G₁ ha sido el centro de la atención en el estudio de la diferenciación, algunos reportes se refieren a la implicación de la fase S y G₂, tal es el caso del tratamiento con apigenina la cual

bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G₂/M en la línea K562 induciendo una diferenciación eritroide (Isoda et al., 2014), en esta investigación se determinó que el IMMUNEPOTENT CRP causó un ligero incremento en la fase S y G₂/M, sin embargo disminuyó significativamente la tasa de proliferación celular de la línea K562 además; cuando las células K562 previamente tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP a dosis de diferenciación durante 96 horas y posteriormente incubadas durante 10 días libres de tratamientos, el porcentaje de proliferación celular fue menor que las células control, sugiriendo que las células K562 experimentaron un proceso de diferenciación celular.

El IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación celular hacia el linaje monocítico/macrófago; determinado por los cambios morfológicos e incremento de la expresión del marcador CD14⁺. El IMMUNEPOTENT CRP induce una diferenciación hacia macrófagos con polarización hacia el fenotipo activado alternativamente o M2, incrementando la expresión del marcador CD163⁺ que es una glicoproteína de superficie celular de la familia de receptores scavenger ricos en cisteína, expresado en monocitos y macrófagos. El fenotipo activado alternativamente juega un papel importante en la protección del huésped previniendo la inflamación excesiva y promueve la reparación tisular (Barilli et al., 2011, Takahashi et al., 2014).

Se determinó que las células diferenciadas con el IMMUNEPOTENT CRP incrementaron su actividad fagocítica similar a las células tratadas con el PMA (Sutherland et al., 1986, Cheng et al., 2004, Spano et al., 2013, Samet et al., 2014).

El mecanismo de acción del IMMUNEPOTENT CRP reduce la producción de óxido nítrico (ON) relacionado a una propiedad antioxidante, debido a que algunos compuestos antioxidantes como las procianidinas que provienen de semillas de uva (GSPs) inducen diferenciación e inhibición de la proliferación en líneas de leucemia incluida K562 (Wang et al, 2012) indicando que las pro-antocianidinas

inducen diferenciación monocítica en las células K562, disminuyendo la formación de ROS debido a su efecto antioxidante y arrestando el ciclo celular en la fase G₁. Por otro lado, los megacariocitos cumplen la función esencial de la producción de plaquetas, la diferenciación megacariocítica de las células K562 inducida por el PMA puede imitar el proceso fisiológico que tiene lugar en la médula ósea en respuesta a una variedad de estímulos (Huo et al., 2006). Los resultados obtenidos indican que el IMMUNEPOTENT CRP induce diferenciación megacariocítica incrementando la expresión de CD42a⁺ similares resultados fueron obtenidos en este trabajo con el tratamiento con el PMA, observándose cambios en la morfología e incremento en la adherencia de las células, resultados similares fueron obtenidos por Bütler (1990), por lo que el PMA es considerado un inductor de la diferenciación megacariocítica en la línea K562 (Huang et al., 2014). Un aumento en la producción de citocinas y quimiocinas fue detectada en los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP y PMA lo que sugiere que la producción de estas proteínas se asocian al proceso de diferenciación celular, por el contrario el DMSO disminuyó la producción, similares resultados fueron obtenidos por Samet et al., 2014; cuando células K562 tratadas con extractos de hoja de *Olea europaea* incrementaron la expresión de los genes de quimiocina CXCL8 (IL-8) (Samet et al., 2014).

El hallazgo encontrado acerca de que el IMMUNEPOTENT CRP a la dosis de 1 U/mL disminuye la viabilidad de las células K562 previamente diferenciadas sin afectar la viabilidad de macrófagos peritoneales murinos y monocitos primarios humanos, podría sugerir la selectividad de acción a través de receptores, en donde las células K562 a pesar de ser diferenciadas mediante el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP probablemente continúan sobre-expresando receptores que son sensibles a dicho tratamiento, induciendo una señalización de muerte celular, contrario a los monocitos y macrófagos los cuales no fueron afectados, a su vez este resultado evidencia que las células tratadas fueron sensibles al IMMUNEPOTENT CRP. Por otro lado; si el potencial de malignidad permanece en las células K562 diferenciadas no fue evaluado en este estudio, ya que para

discernir este objetivo se requiere la inoculación de las células diferenciadas con los tratamientos en ratones inmunodeficientes, evaluando el crecimiento tumoral, lo cual no fue incluido en este proyecto de investigación.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que el IMMUNEPOTENT CRP es capaz de inducir diferenciación hacia los linajes monocítico/macrófago y megacariocítico así como muerte celular sobre la línea mielógena crónica humana K562, sugiriendo que el IMMUNEPOTENT CRP podría ser un candidato efectivo en el tratamiento de las leucemias.

9. LITERATURA CITADA

1. Abbas K Abul, Lichtman Andrew, Pillai Shiv. 2008. Inmunología Celular y Molecular. Elsevier 397-417.
2. Alenad, A.M., Al-Jaber, N.A., Krishnaswamy, S., Yakout S.M., Al-Daghri, N.M. and Alokail, M.S. 2013. *Achillea fragrantissima* extract exerts its anticancer effect via induction of differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562. *Journal of Medicinal Plants Research* 7:1561-1567.
3. Aoki S, Kong D, Matsui K, Kobayashi M. 2004. Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid. *Anticancer Research* 24: 2325-2330.
4. Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Bussolati O, Gazzola GC, Dall'Asta V. 2011. Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology* 90:293-303.
5. Beligory L, Bordone J, Conti R, Freitas J, Larripa I, Milone J, Pavlovsky C, Riveros D, Rojas Francisca, Santos Isabel, Varela A, Ventriglia V. 2008. Leucemia mieloide crónica. *Sociedad Argentina de hematología* 205-220.
6. Borish Larry, MD, Steinke John. 2003. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 460-75.
7. Büttler TM, Ziemiecki A, Friis RR. 1990. Megakaryocytic differentiation of K562 cells is associated with changes in the cytoskeletal organization and the pattern of chromatographically distinct forms of phosphotyrosyl-specific protein phosphatases. *Cancer Research* 50:6323-9.

8. Cheng XD, Hou CH, Zhang XJ, Xie HY, Zhou WY, Yang L, Zhang SB, Qian RL. 2004. Effects of Huangqi (Hex) on Inducing Cell Differentiation and Cell Death in K562 and HEL Cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36: 211–217.

9. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. 2003. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* 17:1211-62.

10. Domen J. 2000. The role of apoptosis in regulating hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Immunologic Research* 22:83-94.

11. Ferry-Dumazet H, Mamani-Matsuda M, Dupouy M, Belloc F, Thiolat D, Marit G, Arock M, Reiffers J, Mossalayi MD. 2002. Nitric oxide induces the apoptosis of human BCR-ABL-positive myeloid leukemia cells: evidence for the chelation of intracellular iron. *Leukemia* 4:708-15.

12. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. 1981. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 58:158-63.

13. Folgueira MA, Federico MH, Roela Ra, Maistro S, Katayama ML, Brentani MM. 2000. Differential regulation of vitamin D receptor expression in distinct leukemic cell lines upon phorbol ester-induced growth arrest. *Brazilian Journal Of Medical Biological Research* 33:559-68.

14. Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Tamez-Guerra RS, Villarreal-Treviño L, Tijerina-Menchaca R, Castillo-León L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C. 2006. *In vitro* antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 28:471-83.

15. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2005. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages *in vitro*. Journal of Medicinal Food 8:20-6.
16. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández DF, Sierra Rivera CA, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Tamez-Guerra R, Rodríguez Padilla C. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. African Journal of Microbiology Research 5:3726-3736.
17. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández DF, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. Cytotherapy 8:408- 414.
18. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, Zamora-Avila D, Rivera-Morales LG, Miranda-Hernández DF, Sierra-Rivera CA, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. Immunopharmacology and Immunotoxicology 32:637-46.
19. Gocek E, Marcinkowska E. 2011. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia. Cancers 16:2402-20.
20. Gómez-Almaguer D, Tarín-Arzaga Luz del Carmen. 2011. Tratamiento de la leucemia mielode crónica en fase crónica: una perspectiva mexicana. Revista de Hematología Mexicana 12:267-275.

21. Huang R, Zhao L, Chen H, Yin RH, Li CY, Zhan YQ, Zhang JH, Ge CH, Yu M, Yang XM. 2014. Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. PLoS One. 9(5): 1-12.
22. Huo XF, Yu J, Peng H, Du ZW, Liu XL, Ma YN, Zhang X, Zhang Y, Zhao HL, Zhang JW. 2006. Differential expression changes in K562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation. Molecular and Cell Biochemistry 292:155-67.
23. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2013. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Disponible en www.inegi.org.mx.
24. Isoda H, Motojima H, Onaga S, Samet I, Villareal MO, Han J. 2014. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. Chemico- Biological Interactions 220: 269-77.
25. Kang CD, Lee BK, Kim Kw, Kim CM, Kim SH, Chung BS. 1996. Signaling mechanism of PMA-induced differentiation of K562. Biochemical and Biophysical Research Communications 5:95-100.
26. Kang HK, Suh JH, Lee JJ, Yoon SH, Hyun JW, Choi SW, Choi JY, Ryu KH, Chung MH. 2003. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by L-ascorbic acid. Free Radical Research 37:773-9.
27. Küçükkaya B, Oztürk G, Yalçintepe L. 2006. Nitric oxide levels during erythroid differentiation in K562 cell line. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 43:2513.

28. Lee YL, Chen CW, Liu FH, Huang YW, Huang HM. 2013. Aclacinomycin A sensitizes K562 chronic myeloid leukemia cells to imatinib through p38 MAPK-mediated erythroid differentiation. *PLoS One* 8:1-9.
29. Lui OL, Mak NK, Leung KN. 2005. Conjugated linoleic acid induces monocytic differentiation of murine myeloid leukemia cells. *International Journal of Oncology*. 27:1737-43.
30. Mata-Greenwood E, Cuendet M, Sher D, Gustin D, Stock W, Pezzuto JM. 2002. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G₁ arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia* 16:2275-84.
31. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. 2007. *Cancerología* 2:95-107.
32. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. 2006. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. *Journal of biochemistry and molecular biology* 39:492-501.
33. Morales C, Torres-Cárdenas V, Valencia J, Ribón G, Manrique R. 2010. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 24:97-108.
34. Navarrete Prida Olga. 2000. Las quimiocinas. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González* 3: 30-32.
35. Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. 2009. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood*. 113:3655-65.

36. Parslow Tristram, Stites Daniel, Terr Abba, Imboden John. 2003. Inmunología básica y clínica. Manual Moderno 10ª edición 202-220.
37. Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. 2015. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation* 22:187-98.
38. Saab Am, Dobmeier M, Koenig B, Fabri E, Finotti A, Borgatti M, Lampronti I, Efferth T, Gambari R. 2013. Antiproliferative and erythroid differentiation of piperazine and triphenyl derivatives against K562 human chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Research* 33:3027-32.
39. Samet I, Han J, Jlaiei L, Sayadi S, Isoda H. 2014. Olive (*Olea europaea*) Leaf Extract Induces Apoptosis and Monocyte/Macrophage Differentiation in Human Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells: Insight into the Underlying Mechanism. *Oxidative Medicine and Cell Longevity* 1-16.
40. Seita J, Weissman IL. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology Medicine* 2:640-53.
41. Spano Alessandra, Barni Sergio, Bertone Vittorio, Sciola Luigi. 2013. Changes on lysosomal compartment during PMA-induced differentiation of THP-1 monocytic cells: Influence of type I and type IV collagens. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:8-18.
42. Spira AI, Carducci MA. 2003. Differentiation therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 3:338-343.
43. Sutherland JA, Turner AR, Mannoni P, McGann LE, Turc JM. 1986. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and

- megakaryocyte lineages. *Journal of Biological Response Modifiers*. 5:250-62.
44. Takahashi H, Hatta Y, Iriyama N, Hasegawa Y, Uchida H, Nekagawa M, Makishima M, Takeuchi J, Takei M. 2014. Induced differentiation of human myeloid leukemia cells into M2 macrophages by combined treatment with retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *PLoS One*. 9:113-22.
45. Valledor AF, Borrás FE, Cullell-Young M, Celada A 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology* 63:405-17.
46. Wang M, Wang L, Pan XJ, Zhang H. 2012. Monocytic Differentiation of K562 Cells Induced by Proanthocyanidins from Grape Seeds. *Archives of Pharmacal Research* 35:129-35.
47. Warr MR, Pietras EM, Passegué E. 2011. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 3:681-701.
48. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VH, Wai H, Böttcher S, Brüggemann M, van der Sluijs AJ, Koning A, Boeckx N, Van Poecke N, Lucio P, Mendonça A, Sedek L, Szczepański T, Kalina T, Kovac M, Hoogeveen PG, Flores-Montero J, Orfao A, Macintyre E, Lhermitte L, Chen R, Brouwer-De Cock KA, van der Linden A, Noordijk AL, Comans-Bitter WM, Staal FJ, van Dongen JJ. 2009. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* 23:1106-17.
49. Xiang L, Dong W, Wang R, Wei J, Qiu G, Cen J, Chen Z, Zheng X, Hu S,

- Xie X, Cao X, Gu W. 2014. All-trans retinoic acid enhances the effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on p16INK4a demethylation, and the two drugs synergistically activate retinoic acid receptor β gene expression in the human erythroleukemia K562 cell line. *Oncology Letters* 8: 117-122.
50. Yin L, Ahmad R, Kosugi M, Kawano T, Avigan D, Stone R, Kharbanda S, Kufe D. 2010. Terminal differentiation of chronic myelogenous leukemia cells is induced by targeting of the MUC1-C oncoprotein. *Cancer Biology and Therapy* 10:483-91.
51. Zhang D, Cho E, Wong J. 2007. A critical role for the co-repressor N-CoR in erythroid differentiation and heme synthesis. *Cell Research* 17:804-14.

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C Crystel Aleyvick Sierra Rivera

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis: Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la inducción de la
diferenciación y muerte celular en la línea de leucemia mielógena crónica
humana K562**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 16 de agosto de 1987,
hija de Alejandro Sierra Gutiérrez y Virginia Rivera Guzmán.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado
obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009 con la tesis titulada
“Efecto de la plata coloidal en líneas celulares de cáncer y evaluación de la
toxicidad inducida relacionada a su consumo prolongado *in vivo*”

Egresada de la UANL, grado obtenido de Maestría en Ciencias con Especialidad
en Inmunobiología en 2011, con la tesis titulada “ Efecto del dicloroacetato de
sodio sobre líneas celulares de cáncer *in vitro* y sobre un modelo de melanoma
murino”

Artículos publicados:

- ❖ 2010. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 29:148.

- ❖ 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32(4): 637-46.
- ❖ 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(22), pp. 3726-3736.
- ❖ 2012. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of sodium dichloroacetate (DCA-Na) against murine melanoma. *African journal of microbiology research* Vol. 6(22), pp. 4782-4796.
- ❖ 2013. Potential of colloidal or silver nanoparticles to reduce the growth of B16F10 melanoma tumors. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(22), pp. 2745-2750.
- ❖ 2013. Expression of Foxp3, CD25 and IL-2 in the B16F10 cancer cell line and melanoma is correlated with tumor growth in mice. *Oncology letters* 6(5): 1195-1200.
- ❖ 2015. Effect of bovine dialyzable leukocyte extract on inducing cell differentiation and cell death in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Oncology Letters*. Aceptado.
- ❖ 2015. Silencing of Foxp3 delays the growth of murine melanomas and modifies the tumor immunosuppressive environment. *OncoTargets and Therapy*. Aceptado.
- ❖ 2015. *Bacillus thuringiensis*: in vitro antitumoral activity of soluble protein extract. *African Journal of Microbiology Research*. Aceptado.